

**Université de Sherbrooke**

**IMPLICATION DE CA125 (MUC16) DANS LA SENSIBILITÉ DES CELLULES DE  
CANCER DE L'OVAIRE AUX AGENTS GÉNOTOXIQUES**

**par**

**Marianne Boivin**

**Département de Microbiologie et Infectiologie**

**Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé**

**en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie**

**Mars 2006**



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-25952-8*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-25952-8*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	II
Liste des figures.....	VI
Liste des tableaux.....	VII
Liste des sigles et abréviations.....	VIII
Résumé	
Introduction	
1. Cancer de l'épithélium de l'ovaire.....	1
1.1 Cancer ovarien épithélial séreux.....	6
1.2 Autres types histologiques de cancer épithélial de l'ovaire.....	6
2. Le cancer.....	7
2.1 Voie de survie PI3K/AKT.....	7
2.2 L'apoptose.....	9
2.2.1 La voie mitochondriale.....	12
2.2.2 La voie des récepteurs de mort cellulaire.....	13
2.2.3 Apoptose et cancer.....	14
3. Le traitement du cancer de l'ovaire.....	15
3.1 Les drogues inhibitrices de la dynamique des microtubules.....	16
3.2 Les drogues liant l'ADN.....	17
3.3 Les drogues inhibitrices de l'enzyme topoisomérase.....	23
3.4 La résistance à la chimiothérapie.....	23

4.	Marqueurs du cancer de l’ovaire.....	24
4.1	Les mucines.....	25
4.1.1	La mucine MUC1.....	27
5.	CA125.....	30
5.1	Historique.....	30
5.2	Importance clinique de CA125.....	30
5.3	Le gène de CA125.....	32
5.4	Caractéristiques et expression de CA125.....	36
5.5	Rôles de CA125.....	37
5.6	Modèle d’étude de CA125 établi dans le laboratoire.....	38
5.6.1	Fonctions de CA125 démontrées avec les clones exprimant un scFv anti-CA125.....	39
6.	Hypothèse et objectifs.....	42
Matériels et méthodes		
7.	Culture cellulaire.....	44
7.1	Traitement des cellules au cisplatine.....	46
8.	Mesure de la sensibilité aux agents génotoxiques par essai XTT.....	46
9.	Cytométrie de flux.....	47
10.	Immunofluorescence indirecte sur lame.....	49
11.	Lyse cellulaire.....	50
11.1	Dosage protéique.....	52
12.	Mesure de l’activité de la caspase-3.....	52
13.	Immunoprécipitation.....	54
14.	Gel SDS-PAGE, immunobuvardage de type western, coloration au Sypro Ruby et	



	coloration au nitrate d'argent.....	55
14.1	Identification par spectrométrie de masse de protéines migrées sur gel.....	57
15.	Extraction d'ARN.....	58
15.1	Synthèse de l'ADNc.....	59
16.	Amplification des inserts et clonage.....	59
16.1	Descriptions des plasmides.....	59
16.2	Amplification d'ADN par PCR.....	63
16.3	Clonage.....	65
16.4	Transformation bactérienne par choc thermique.....	67
17.1	Transfection cellulaire transitoire.....	68
17.2	Transfection cellulaire stable.....	69
18.	Purification de protéines par colonne de nickel.....	70
<b>Résultats</b>		
19.	Sensibilité aux agents cytotoxiques des cellules CA125-knockdown.....	74
20.	Expression de surface de CA125 lors d'un traitement au cisplatine.....	76
21.	Niveaux d'expression de base des molécules de la cascade apoptotique.....	83
22.	Mesure de l'activité basale de la caspase-3.....	83
23.	Niveaux d'activation de la caspase-9 et -3 après un traitement au cisplatine.....	89
24.	Mesure de l'activité de la caspase-3 après un traitement au cisplatine.....	92
25.	Mesure du clivage de PARP après un traitement au cisplatine.....	95
26.	Niveaux endogènes de AKT et P-AKT.....	98
27.	Niveaux endogènes de FOXO3a.....	101
28.	Localisation cellulaire de FOXO3a.....	104

29.	Constructions des plasmides pour le Tandem Affinity Purification (TAP).....	107
29.1	Validation des constructions par transfection transitoire dans un modèle eucaryote .....	116
29.2	Validation de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD.....	119
30.	Étude de gain de fonction de CA125 : sensibilité au cisplatine et au taxol de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD.....	126
31.	Mise au point des conditions d'immunoprécipitation de CA125 endogène.....	130
31.1	Analyse par spectrométrie de masse de l'immunoprécipitation de CA125 endogène .....	131
32.	Essai préliminaire de purification de la protéine de fusion MUC16-TMcyto par colonne de nickel.....	138
Discussion et conclusions		
33.	Validation des outils du TAP et de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD....	144
34.	CA125 et la sensibilité aux agents génotoxiques.....	147
35.	Statut de CA125 et traitement du cancer de l'ovaire.....	158
36.	Conclusions et perspectives.....	160
Remerciements.....		164
Références.....		165

## LISTE DES FIGURES

1.	Les deux voies apoptotiques.....	11
2.	Mécanisme d'action du taxol.....	19
3.	Produits de réaction du cisplatine avec l'ADN.....	22
4.	Structure hypothétique de CA125.....	35
5.	Validation des clones CA125-knockdown.....	41
6.	Cartes des plasmides.....	62
7.	Sensibilité des cellules CA125-knockdown aux drogues de chimiothérapie.....	78
8.	Expression de surface de CA125 après un traitement au cisplatine.....	82
9.	Niveaux endogènes des molécules de la cascade apoptotique.....	85
10.	Mesure de l'activité basale de la caspase-3.....	88
11.	Activation de la caspase-3 et de la caspase-9 lors d'un traitement au cisplatine.....	91
12.	Activité de la caspase-3 après traitement au cisplatine.....	94
13.	Clivage de PARP lors d'un traitement au cisplatine.....	97
14.	Niveaux d'expression de base de AKT et P-AKT.....	100
15.	Niveaux d'expression endogènes de FOXO3a.....	103
16.	Localisation cellulaire de FOXO3a par immunofluorescence indirecte sur lame.....	106
17.	Modèle du Tandem Affinity Purification.....	110
18.	Amplification des inserts pour le clonage de MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD.....	112

19.	Validation de clones positifs de MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD .....	115
20.	Validation des constructions du TAP dans un système eucaryote transitoire.....	121
21.	Validation de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD.....	125
22.	Essais de sensibilité de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD au taxol et au cisplatine.....	129
23.	Mise au point des conditions d'immunoprécipitation de CA125 endogène.....	133
24.	Validation de l'immunoprécipitation de CA125 endogène.....	136
25.	Purification de la protéine de fusion MUC16-TMcyto par colonne de nickel.....	143

## LISTES DES TABLEAUX

1.	Stades de développement du cancer de l'ovaire.....	2
2.	Conditions de PCR.....	64
3.	Liste des anticorps primaires utilisés et conditions d'utilisation.....	72
4.	Anticorps secondaires utilisés et conditions d'utilisation.....	73
5.	Identification par spectrométrie de masse des protéines présentes dans les complexes immunoprécipités.....	137

## LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

aa	acide aminé
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	acide déoxyribonucléique complémentaire
AFC	7-amino-4-trifluoromethyl coumarin
AIF	apoptosis inducing factor
AKT	protéine kinase B ou PKB
AMV-RT	avian myeloblastosis virus reverse transcriptase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATCC	american type culture collection
ATG	adénine-tyrosine-guanine
ATP	adénosine triphosphate
BH	Bcl-2 homology
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovine serum albumine
CA125	cancer antigen 125
CAD	caspase-activated deoxyribonuclease
CMV	cytomégalovirus
CTD	C-terminal domain
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol

DD	death domain
DED	death effector domain
DEVD	aspartate- glutamate-valine-aspartate
DISC	death-inducing signalling complex
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
dNTP	deoxy nucleotide triphosphate
DTT	dithiothreitol
E	élution
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	ethylenebis(oxoethylenitrilo)tetracetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
F	flow-through
FADD	Fas-associated DD containing protein
FANC	Fanconi anemia
FasL	Fas ligand
FBS	fetal bovine serum
FIGO	International Federation of Obstetrics and Gynecology
FOXO	Forkhead box subgroup O
GAPDH	glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GFP	green fluorescent protein

GSK3 $\beta$	glycogene synthase kinase $\beta$
HRP	horseradish peroxydase
HSP	heat shock protein
XIAP	inhibitor of apoptosis protein X
IC50	inhibitory concentration 50%
IgG	immunoglobuline G
IP	immunoprécipitation
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
KDEL	lysine-aspartate-glutamine-leucine
KRRR	lysine-arginine-arginine-arginine
L	lavage
LC MS/MS	liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry
LB	Luria broth
MUC	mucine
NIH	National Institutes of Health
Ni-NTA	nickel-nitriloacetic acid
NK	natural killer
NLS	signal de localisation nucléaire
NP-40	Nonidet-P-40
P-AKT	AKT phosphorylé
PARP	poly(ADP-ribose) polymérase
pb	paire de base

PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	phycoérythrine
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PI3KCA	phosphatidylinositol 3-kinase constitutif actif
PKC	protéine kinase C
PMS	phenazine methosulfate
PTEN	phosphatase and tensin homologue tumor suppressor
RB	retinoblastoma protein
RE	reticulum endoplasmique
RFU	relative fluorescence unit
RNF5	RING-finger protein 5
ROS	reactive oxygene species
rpm	revolution per minute
RPMI	roswell park memorial institute medium
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
ScFv	single-chain fragment variable
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEA	sperm protein, enterokinase and agrin
SV-40	simian virus 40
TACE	(TNF)- $\alpha$ converting enzyme
TAP	tandem affinity purification



t-Bid	Bid tronqué
TGF	transforming growth factor
TMcyto	transmembranaire-cytoplasmique
TNF	tumor necrosis factor
TOF	time-of-flight
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
U	unité
UniqueTMcyto	domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125
XTT	2,3-bis(2methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)2H-tetrazolium-5- carboxyanilide

## RÉSUMÉ

L'antigène tumoral CA125 est surexprimé dans 80% des cas de cancer de l'ovaire et ses fonctions sont encore inconnues. En se basant sur l'analogie avec MUC1, qui confère une résistance à l'apoptose induite par les agents génotoxiques, nous avons émis l'hypothèse que CA125 pourrait moduler la réponse à la chimiothérapie des cellules de cancer de l'ovaire.

Le but de ce projet est de déterminer l'implication de CA125 dans la sensibilité aux agents cytotoxiques des cellules de cancer épithélial de l'ovaire. Le modèle utilisé consiste en des clones stables dérivés de la lignée de cancer de l'ovaire NIH :OVCAR-3 exprimant un mini-anticorps, ou scFv, dirigé contre CA125. Ce scFv possède un signal de rétention au RE, ce qui permet de séquestrer CA125 au RE et d'empêcher sa localisation naturelle à la surface cellulaire (clones CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7). Le clone contrôle exprimant un scFv qui ne lie pas CA125 est nommé scFv contrôle. La sensibilité des cellules aux agents cytotoxiques a été mesurée par une mesure de la viabilité cellulaire par essai XTT et les drogues testées sont de différents types: drogues liant l'ADN (cisplatine, cyclophosphamide, doxorubicine), drogues inhibiteurs de la dynamique des microtubules (taxol, vinorelbine) et drogue inhibant la topoisomérase II (etoposide).

Les résultats obtenus montrent que les clones CA125-knockdown (1 :9 #9 et 1 :9 #7) sont de trois à cinq fois plus sensibles aux drogues qui affectent l'ADN (cisplatine, doxorubicine, cyclophosphamide, etoposide) par rapport aux cellules contrôles (scFv contrôle et lignée

parentale OVCAR-3). Par contre, aucune différence de sensibilité n'a été observée pour ce qui est des drogues inhibant la dynamique des microtubules. Des analyses des niveaux endogènes des molécules de la cascade apoptotique et de l'activité basale de la caspase-3 n'ont démontré aucune différence significative chez les clones CA125-knockdown par rapport aux cellules contrôles. Lors du traitement des cellules au cisplatine, une augmentation de l'activation des caspases-3 et -9 de même qu'une augmentation de l'activité de la caspase-3 ont été démontrées, ce qui confirme que les cellules meurent par apoptose. Les cellules CA125-knockdown 1:9 #9 et 1:9 #7 montrent des niveaux endogènes de P-AKT plus élevés et une diminution de la localisation nucléaire du facteur de transcription FOXO3a, ce qui suggèrent une modulation de la réponse au stress et de la réparation de l'ADN. De plus, l'expression forcée des domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125 (MUC16-CTD) dans la lignée SKOV-3 confère une résistance de ces cellules aux drogues génotoxiques.

Ces résultats suggèrent que CA125 régule la sensibilité aux agents génotoxiques et que le domaine C-terminal est suffisant pour effectuer cette modulation. L'augmentation de la sensibilité aux agents génotoxiques pourrait être causée par la modification de voies en amont de la caspase-9 chez les cellules CA125-knockdown ou par une diminution de la localisation nucléaire de FOXO3a qui affecterait la réparation de l'ADN. Ces données amènent l'hypothèse que le statut tumoral de CA125 pourrait influencer la réponse à la chimiothérapie des patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire.

Mots clés : Cancer, ovaire, CA125, chimiothérapie, apoptose.

## INTRODUCTION

### 1. Cancer de l'épithélium de l'ovaire

Mondialement, le cancer de l'épithélium de l'ovaire est classé cinquième au rang des cancers les plus mortels chez la femme (MARTIN, 2002). Ce cancer est le cancer gynécologique le plus létal (OZOLS et al, 2004). En 2005, au Canada, il a été estimé que 2400 nouveaux cas de cancer épithélial de l'ovaire seraient déclarés, et que, dans la même année, 1550 femmes en mourraient (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER). Les raisons majeures expliquant le haut taux de mortalité de ce cancer sont que les premiers stades de la maladie sont asymptomatiques et qu'il y a un manque d'outils diagnostiques assez sensibles et assez spécifiques pour détecter la maladie à un stade précoce, ce qui fait en sorte que la maladie est souvent diagnostiquée à un stade avancé (SCHUMMER et al, 1999; MARTIN, 2002; WHITEHOUSE et Solomon, 2003). En 1986, le cancer de l'ovaire a été divisé en différents stades selon plusieurs critères de progression de la maladie tels que l'atteinte d'un ou des deux ovaires, la présence d'ascite, l'invasion d'autres sites et la taille des masses métastatiques (MARTIN, 2002; FIGO CANCER COMMITTEE, 1986). Les stades de développement sont présentés dans le tableau 1 (MARTIN, 2002).

**Tableau 1 : Stades de développement du cancer de l’ovaire (MARTIN, 2002).**

STADES	DESCRIPTION
Stade I	Croissance limitée aux ovaires
Stade IA	Croissance limitée à un ovaire, pas d’ascite. Pas de tumeur sur la surface externe, capsule intacte.
Stade IB	Croissance limitée aux deux ovaires, pas d’ascite. Pas de tumeur sur la surface externe, capsules intactes.
Stade IC	Stade tumoral IA ou IB, mais avec tumeur sur la surface de un ou des deux ovaires, avec rupture de la capsule et avec présence d’ascite contenant des cellules malignes ou un lavage de la cavité péritonéale positif.
Stade II	Croissance impliquant un ou les deux ovaires avec extension pelvienne
Stade IIA	Extension ou métastases à l’utérus ou aux trompes de Fallope
Stade IIB	Croissance impliquant un ou les deux ovaires avec extension pelvienne
Stade IIC	Tumeur de stade IIA ou IIB avec tumeur sur la surface de un ou des deux ovaires, avec rupture de la capsule et avec présence d’ascite contenant des cellules malignes ou un lavage de la cavité péritonéale positif.
Stade III	Tumeur impliquant un ou les deux ovaires avec implantations péritonéales en dehors du bassin, métastases superficielles au foie, tumeur limitée au bassin mais extension maligne au petit intestin vérifiée histologiquement
Stade IIIA	Tumeur grossièrement limitée au bassin et négative aux ganglions mais avec confirmation histologique de dissémination microscopique aux surfaces abdominales péritonéales.
Stade IIIB	Tumeur sur un ou les deux ovaires avec confirmation histologique d’implantations à la surface abdominale péritonéale n’excédant pas 2 cm de diamètres. Ganglions négatifs.
Stade IIIC	Implants abdominaux plus grands que 2 cm de diamètre ou ganglions positifs.
Stade IV	Croissance impliquant un ou les deux ovaires avec métastases distantes. S’il y a effusion pleurale, il doit y avoir un résultat de test cytologique positif pour déclarer le cas comme stade IV. Métastases parenchymateuses au foie.

La majorité des femmes sont diagnostiquées avec un cancer ovarien épithélial de stade FIGO III (OZOLS et al, 2004). En fait, 75% des femmes sont diagnostiquées à des stades III ou IV (LU et al, 2004). À ces stades, il y a déjà apparition de métastases, ce qui rend le traitement de la patiente difficile. Le moment du diagnostic est très important dans la détermination des chances de survie de la patiente. En fait, une patiente diagnostiquée à un stade précoce de la maladie (I ou IIA) a entre 70% et 90% de chance de survie cinq ans après son diagnostic. Par contre, une patiente diagnostiquée avec un cancer ovarien épithélial de stade avancé (IIB, IIC, III ou IV) n'a que 20% de chances de survie cinq ans après son diagnostic (KALIL & McGUIRE, 2002). Un autre facteur contribuant à la haute mortalité des patientes atteintes de cancer épithélial de l'ovaire est l'âge avancé des patientes, la moyenne d'âge des patientes diagnostiquées avec ce type de cancer étant de 63 ans (OZOLS et al, 2004).

Certaines habitudes ou conditions ont un effet protecteur contre le cancer de l'ovaire. La prise de contraceptifs oraux, la grossesse, la ligature des trompes de Fallope, l'hystérectomie et l'allaitement permettraient de diminuer les chances de développer cette maladie. D'autres part, certains facteurs environnementaux, une diète riche en gras animal et en viande, l'utilisation de certains déodorants génitaux ainsi que des conditions telles que la ménopause tardive, la nulliparité et les thérapies hormonales ou de fertilité augmenteraient les chances de développement du cancer de l'ovaire (MARTIN, 2002). Certains cas de cancer de l'ovaire sont génétiques : le risque pour une femme de développer un cancer de l'ovaire dans sa vie est de 1.5% et 10% de ces cas sont des femmes ayant une historique familiale de cancer de l'ovaire ou du sein (CLAUS et al, 1996). Les deux gènes de susceptibilité au

cancer du sein et de l'ovaire les plus connus sont BRCA1 et BRCA2 (OZOLS et al 2004). Les mutations germinales de BRCA1 sont responsables de 45% des cas de cancer du sein familiaux et de 80% des cas de cancer du sein et de l'ovaire familiaux. Quant à BRCA2, les femmes porteuses de mutations sur ce gène ont un risque augmenté de cancer du sein et comptent pour 10% à 35% des cas de cancer ovarien familiaux (WANG, 2002). Il est à noter que les mutations somatiques de BRCA1 et BRCA2 sont rares mais que certains changements épigénétiques de ces gènes ou de leur promoteur sont la cause de 5 à 10% des cas de cancer de l'ovaire sporadique (OZOLS et al, 2004).

Certains oncogènes surexprimés, mutés ou amplifiés par rapport au contexte normal ont été ciblés pour leur implication dans le cancer de l'ovaire (ISMAIL et al, 2000). Parmi ceux-ci, notons RAS, AKT2, PI3KCA, c-myc, ErbB2 et EGFR (FUJITA et al, 2003, SCHUIJER et BERNES, 2003; LIU et al, 1998; LEVINE et al, 2005; PACK et al, 2004; SHAYESTEH et al, 1999; GULLICK, 1991, WANG, 2002). En ce qui concerne les suppresseurs de tumeur, ils sont soit mutés, sous-exprimés ou leur promoteur est inactivé. Dans le cancer épithélial ovarien, les suppresseurs de tumeurs impliqués sont entre autres p27KIP1, RB1, p53, PTEN, BRCA1, BRCA2 (TAMMELA, 2004; WANG, 2002; SCHUIJER et BERNES, 2003; RHEI et al, 1998).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'étiologie du cancer de l'ovaire. Une des deux théories principales est l'hypothèse de l'ovulation incessante ou l'hypothèse de Fathalla qui stipule que le risque de développer un cancer de l'ovaire augmente avec le nombre d'événements d'ovulation (OZOLS et al, 2004). Elle propose que l'ovulation, qui cause la

rupture de l'épithélium de l'ovaire à chaque cycle ovulatoire, entraîne des dommages nécessitant une réparation immédiate. Cette succession de réparations et de prolifération de l'épithélium de l'ovaire augmente les chances qu'une erreur survienne durant la réplication de l'ADN, menant ainsi à une mutation potentiellement cancérigène (FLEMING et al, 2005). L'autre hypothèse majeure est celle des gonadotropines et postule que la vague de gonadotropines qui initie chaque ovulation et persiste à de hauts niveaux lors de la ménopause stimule les cellules de la surface de l'épithélium de l'ovaire et induit leur transformation (OZOLS et al, 2004).

La surface de l'épithélium de l'ovaire subit généralement la métaplasie en différents dérivés du conduit Mullérien ayant des ressemblances morphologiques et sécrétrices avec les tissus épithéliaux et stromaux des trompes de Fallope, de l'endomètre ou du col de l'utérus. Ce sont respectivement les types de tumeurs de cancer de l'ovaire dites séreuses, endométrioides et mucineuses. Un quatrième type, celui des tumeurs cellules-claires, est distingué par un regroupement de cellules épithéliales dans un réseau fibromateux (MURDOCH et McDONNEL, 2002; FLEMING et al, 2005). De plus, certaines tumeurs sont classées dans la catégorie des tumeurs pauvrement différenciées (MARTIN, 2002).



### 1.1 Cancer ovarien épithélial séreux

Le cancer ovarien épithélial séreux est le type histologique de cancer épithélial de l'ovaire le plus commun (KAKU et al, 2003). Le type séreux représente presque la moitié de tous les cas de cancer ovarien. La majorité des patientes ayant une tumeur séreuse de l'épithélium de l'ovaire sont positives lorsque testées pour le marqueur CA125 (OZOLS, 2003).

### 1.2 Autres types histologiques de cancer épithélial de l'ovaire

Les cancers épithéliaux de l'ovaire de type mucineux, endométriøide et cellules-claires sont moins fréquents que le type séreux. Les tumeurs mucineuses correspondent au second type le plus fréquent de cancer de l'ovaire épithélial. Ces dernières sont négatives pour CA125, tandis que les tumeurs endométriøides sont positives pour CA125 (DAVIS et al, 1986; OZOLS, 2003). Finalement, le cancer épithélial de l'ovaire de type cellules-claires ne comprend que de 5% à 10% de tous les cas de cancer de l'ovaire dans les pays occidentaux (KAKU et al, 2003). Il constitue le type le plus agressif et le plus mortel des cancers de l'ovaire épithélial (OZOLS, 2003; MURDOCH et McDONNEL, 2002). Il

## 2. Le cancer

L'apparition et la progression d'un cancer est un processus à étapes multiples. La somme de plusieurs événements ponctuels est nécessaire à la production d'une tumeur maligne (YUSPA, 2000). Il a été suggéré que six altérations essentielles de la physiologie cellulaire soient nécessaires à la croissance tumorale : une indépendance autosuffisante pour les signaux de croissance, une insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance, un potentiel réplicatif illimité, une angiogénèse soutenue, l'invasion de tissus et la formation de métastases et l'évitement de l'apoptose (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). Dans ce dernier cas, l'évasion de la mort cellulaire programmée, ou apoptose, par la cellule cancéreuse peut être possible par la modification des voies de survie cellulaire ou des voies apoptotiques.

### 2.1 Voie de survie PI3K/AKT

La survie cellulaire dépend en grande partie de la voie PI3K/AKT, qui est la voie principale de la survie (SEN et al, 2003). AKT est une cible en aval de l'activation des récepteurs de facteurs de croissance. Lors d'un stimulus de croissance, PI3K est activé par les récepteurs de croissance, ce qui lui permet de produire le second messager nécessaire à l'activation subséquente de AKT (OSAKI et al, 2004). Cette kinase promouvoit la survie, la

prolifération, la croissance et la motilité des cellules, de même que l'angiogénèse et le métabolisme du glucose (SEN et al, 2003). Son implication dans tous ces processus témoigne de la réputation de AKT en tant qu'oncogène (ARBOLEDA et al, 2003; LIU et al, 1998; SHACK et al, 2003). Par contre, il y a de récentes évidences qui indiquent que, dans certains contextes, AKT pourrait être pro-apoptotique. Par exemple, en 2003, le groupe du Dr Holbrook a démontré que, dans des cellules surexprimant la cavéoline, la suractivation de AKT sensibilisait les cellules à l'apoptose induite par les arsénites ou le peroxyde. L'introduction d'un dominant négatif de AKT dans ces cellules améliorait la survie des cellules traitées avec ces agents cytotoxiques (SHACK et al, 2003).

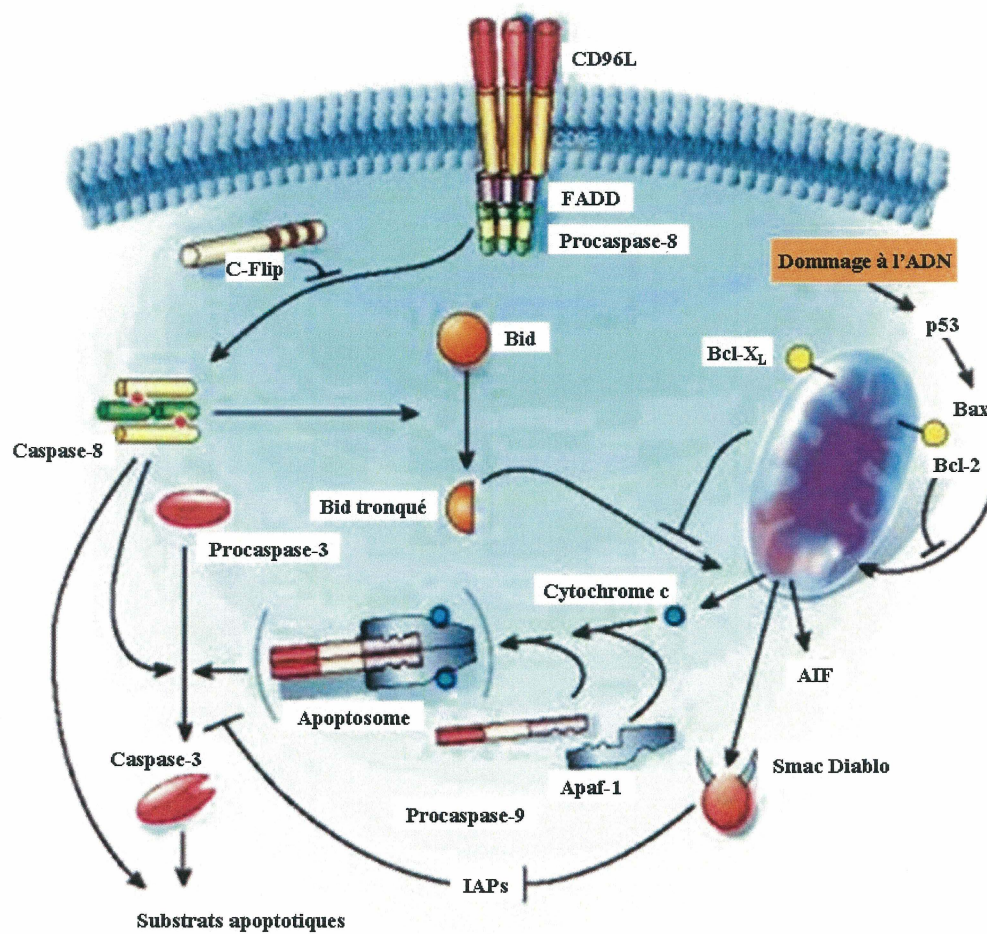
Une des nombreuses cibles de AKT est l'homologue pro-apoptotique Bad. En étant phosphorylé par AKT, Bad est inactivé et ne peut remplir sa fonction pro-apoptotique (OSAKI et al, 2004). Le facteur de transcription de la famille des forkhead FOXO3a est une autre cible de AKT (KOPS et BURGERING, 1999, SKURK et al, 2004). Ce dernier régule FOXO3a en contrôlant la localisation cellulaire de ce dernier par sa phosphorylation. Lorsque les niveaux de AKT actif sont bas, les niveaux de FOXO3a phosphorylé sont bas. FOXO3a peut ainsi transloquer au noyau et exercer son activité transcriptionnelle. Par contre, lorsque la cellule est stimulée par des facteurs de croissance, AKT est fortement activé et phosphorylera FOXO3a, qui sera alors retenu au cytoplasme par des protéines chaperonnes et ne pourra transloquer au noyau (SKURK et al, 2004). Parmi les gènes cibles de FOXO3a, notons certains membres de la famille Bcl-2 ainsi que des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN lésé par les ROS (espèces d'oxygène réactives) (LIU et al, 2005, SUNTERS et al, 2003).

## 2.2 L'apoptose

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, se définit par le suicide continu de cellules somatiques pour garantir la survie, le bon fonctionnement et le développement d'un organisme multicellulaire (KROEMER et al, 1995; CORY et al, 2003). L'apoptose élimine toute cellule redondante, endommagée ou faible qui pourrait contribuer à des conditions anormales et est morphologiquement définie par la condensation et la fragmentation nucléaire, la coupure de l'ADN internucléosomal et la formation d'un corpuscule apoptotique (CORY et al, 2003; EDINGER et THOMPSON, 2004). L'apoptose est en fait divisée en deux voies majeures : la voie des récepteurs de mort cellulaire, ou voie extrinsèque, et la voie mitochondriale, ou voie intrinsèque (HAJRA et LIU, 2004). Ces deux voies impliquent l'activation de cascades d'enzymes nommées les caspases, une famille de cystéine-protéases qui sont les enzymes effectrices de l'apoptose (HAJRA et LIU, 2004; CREAGH et MARTIN, 2001). Toutes les caspases existent sous forme "pro" inactives et doivent être clivées pour être actives (ADAMS et CORY, 2002; BOATRIGHT et SALVESEN, 2003). La figure 1 montre les deux voies de l'apoptose (Tiré et modifié du site web [www.canal-u.education.fr](http://www.canal-u.education.fr)).

**Figure 1. Les deux voies apoptotiques.**

La voie mitochondriale (à droite) et la voie des récepteurs de mort cellulaire (à gauche)([www.canal-u.education.fr](http://www.canal-u.education.fr)). L'apoptose est divisée en deux voies majeures : la voie des récepteurs de mort cellulaire, ou voie extrinsèque, et la voie mitochondriale, ou voie intrinsèque (HAJRA et LIU, 2004). Ces deux voies activent des cascades d'enzymes nommés les caspases, une famille de cystéine-protéases qui sont les enzymes effectrices de l'apoptose (HAJRA et LIU, 2004; CREAGH et MARTIN, 2001).



### 2.2.1 La voie mitochondriale

Premièrement, la voie mitochondriale implique la famille Bcl-2. Cette famille de protéines compte plus de 20 membres, tous ayant au moins un domaine d'homologie à Bcl-2, qu'on nomme domaine BH (PETROS et al, 2004). Il y a trois sous-familles : Bcl-2, Bax et "BH3-seulement" (BH3-only). Les homologues de ces sous-familles sont caractérisées par les différents domaines BH qu'ils contiennent (ADAMS et CORY, 2001; PETROS et al, 2004). La sous-famille Bcl-2 représente les membres anti-apoptotiques, c'est-à-dire qui remplissent un rôle protecteur contre l'apoptose. Parmi ceux-ci, on compte Bcl-2 lui-même, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w et Mcl1. Ils maintiennent l'intégrité membranaire de la mitochondrie et empêchent ainsi la relâche de molécules pro-apoptotiques, telles que le cytochrome C et AIF. La sous-famille Bax regroupe une partie des homologues pro-apoptotiques, dont Bax, Bak et Bok. Ces protéines, lors de l'apoptose, oligomérisent dans la membrane externe de la mitochondrie et permettent ainsi la sortie, entre autre, du cytochrome C. Finalement, la sous-famille "BH3-seulement", comprenant entre autres Bim, Bid et Bad, est aussi un regroupement de molécules pro-apoptotiques. Ces protéines sont des sentinelles qui détectent les stimuli apoptotiques (irradiation ultraviolette, drogues cytotoxiques, etc) et qui sont en temps normal inhibées, souvent par phosphorylation ou séquestration dans le cytosquelette (MacFARLANE, 2003). Lors d'un stimulus, les homologues BH3 seulement sont relâchés et inhibent la sous-famille anti-apoptotique Bcl-2, ce qui permet à la sous-famille Bax de faire une brèche dans la mitochondrie (CORY et ADAMS, 2002; CORY et al, 2003; ZIMMERMANN et al, 2001). L'ouverture de la membrane externe de la

mitochondrie permet la relâche, en outre, du cytochrome c, ce qui contribue à la formation de l'apoptosome et l'activation de la pro-caspase initiatrice 9 (WANG, 2001; ADRAIN et MARTIN, 2001; ADAMS et CORY, 2002; CAIN et al, 2002; ZOU et al, 1999; SRINIVASULA et al, 1998). Ensuite, la caspase-9 activée procède à son tour à l'activation des caspases effectrices dont la caspase-3, qui activeront d'autres caspases effectrices et couperont aussi divers substrats dans la cellule, menant celle-ci à la mort (SLEE et al, 1999; SALVESEN et DIXIT, 1997; FUENTES-PRIOR et SALVESEN, 2004). Parmi les dizaines de substrats de la caspase-3, on retrouve entre autres la CAD, une DNase qui est activée lorsque clivée, et PARP, une poly(ADP-ribose) polymérase qui est inactivée suite à sa coupure par la caspase-3 (AMÉ et al, 2004; FUENTES-PRIOR et SALVESEN, 2004). La caspase-3 peut aussi cliver et activer la caspase-9, ce qui crée une cascade d'amplification du signal apoptotique (FUJITA et al, 2001; SALVESEN et ABRAMS, 2004). La voie mitochondriale de l'apoptose peut aussi se faire de manière caspase-indépendante via AIF. Lors de l'induction de l'apoptose, AIF transloque de la mitochondrie jusqu'au noyau et cause la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN sans qu'il y ait nécessairement activation des caspases (WANG, 2001).

### 2.2.2 La voie des récepteurs de mort cellulaire

La voie des récepteurs de mort cellulaire a certains points en commun avec la voie mitochondriale, ces deux voies apoptotiques pouvant d'ailleurs interagir (CHEN et WANG,



2002). La voie des récepteurs de mort cellulaire est activée par la liaison d'un ligand, par exemple Fas ou TRAIL, à leur récepteur respectif localisé à la membrane cellulaire (ZIMMERMANN et al, 2001; KIMBERLEY et SCREATON, 2004; PETER et KRAMMER, 2003). Ensuite, les récepteurs activés oligomérisent et interagissent avec FADD via des domaines d'interactions DD. FADD recrute ensuite la caspase effectrice 8 (ou la 10) via des domaines DED, le complexe permettant l'activation de la pro-caspase-8 en caspase-8 active étant nommé le DISC (ASHKENAZI et DIXIT, 1998; MACFARLANE, 2003; WALCZAK et SPRICK, 2001). Par la suite, la caspase-8 activera des caspases effectrices, dont la procaspase-3 qui est commune aux voies mitochondriale et des récepteurs de mort cellulaire. La caspase-3 peut alors cliver la caspase-8, ce qui crée une boucle d'amplification. La caspase-8 peut aussi cliver Bid et ainsi faire la transition vers la voie intrinsèque en activant la caspase-9 puis la caspase-3, créant ainsi une amplification du signal apoptotique (voir figure 1) (BOATRIGHT et SALVESEN, 2003).

### 2.2.3 Apoptose et cancer

Les cellules cancéreuses existent grâce à leur capacité à contourner la sélection naturelle qui, normalement, les auraient éliminées à cause de leur potentiel dangereux. Ces cellules ont développé des moyens d'éviter l'apoptose en augmentant leur autonomie face aux facteurs de croissance externes, aux nutriments et aux signaux de survie contact-dépendants (LIOTTA et KOHN, 2004). Ceci est rendu possible entre autres grâce à la modification de

la séquence ou de l'expression de protéines impliquées dans l'apoptose. Par exemple, lors d'un cancer, il peut y avoir surexpression des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, ce qui faciliterait la tumorigénèse. D'un autre côté, l'invalidation du gène de Bax a démontré la nature suppresseur de tumeur de cette protéine (WYLLIE et al, 1999; HEISER et al, 2004). De plus, les cellules cancéreuses peuvent échapper à l'anoïkose, c'est-à-dire l'apoptose des cellules sans ancrage, et ainsi participer au processus métastatique (MARTIN et VUORI, 2004; FRISCH et SCREATON, 2001; GROSSMAN, 2002).

### 3. Le traitement du cancer de l'ovaire

La première étape de traitement d'une patiente atteinte de cancer de l'ovaire est la chirurgie. Pour une patiente atteinte d'un cancer de l'ovaire de stade précoce, la chirurgie permet d'enlever la totalité de la tumeur et d'effectuer des procédures permettant de déterminer le stade exact de la maladie. Pour une patiente diagnostiquée avec un cancer de l'ovaire de stade avancé, la chirurgie est dite réductive, c'est-à-dire que les médecins enlèvent toute tumeur visible. Toutefois, retirer toutes les traces de cancer s'avère la plupart du temps impossible (CHI et HOSKINS dans BARTLETT, 2000). La patiente doit alors subir un traitement de chimiothérapie de première ligne, souvent une combinaison cisplatine-taxol (SMITH et al, 2005). Après cette première série de traitement, 80% des patientes ont une réduction significative de la tumeur et 40% à 60% de celles-ci n'ont plus de tumeur détectable (AGARWAL et KAYE, 2003). Malheureusement, environ 18 mois après cette

rémission, la plupart des patientes font une récurrence, ce qui nécessitera des traitements palliatifs dits de deuxième ligne (AGARWAL et KAYE, 2003; KALIL et McGUIRE, 2002; BALCH et al, 2004). Toutefois, la majorité des femmes diagnostiquées initialement avec un cancer de l'ovaire de stade avancé mourront, dû au développement de résistance aux agents de chimiothérapie (AGARWAL et KAYE, 2003). De plus, à des stades avancés, lorsque la maladie s'est étendue au-delà des ovaires, la chimiothérapie devient beaucoup moins efficace (FRASER et al, 2003).

La chimiothérapie induit l'apoptose chez les cellules cibles et est fondée sur le principe selon lequel les cellules cancéreuses prolifèrent plus vite que les cellules normales (GADDUCI et al, 2002). Les drogues utilisées en chimiothérapie du cancer de l'ovaire sont de différents types selon leur cible dans la cellule. Parmi les types de drogues les plus utilisées se trouvent les drogues inhibitrices de la dynamique des microtubules, les drogues se liant à l'ADN et les drogues inhibitrices de l'enzyme topoisomérase.

### 3.1 Les drogues inhibitrices de la dynamique des microtubules

Les drogues inhibitrices de la dynamique des microtubules comprennent entre autres les vinca alcaloïdes, comme la vinorelbine, et les taxanes, comme le taxol (AGARWAL et KAYE, 2003; JORDAN et WILSON, 2004). Les microtubules, une des composantes clé du cytosquelette, sont essentiels au transport vésiculaire, à la maintenance de la forme de la

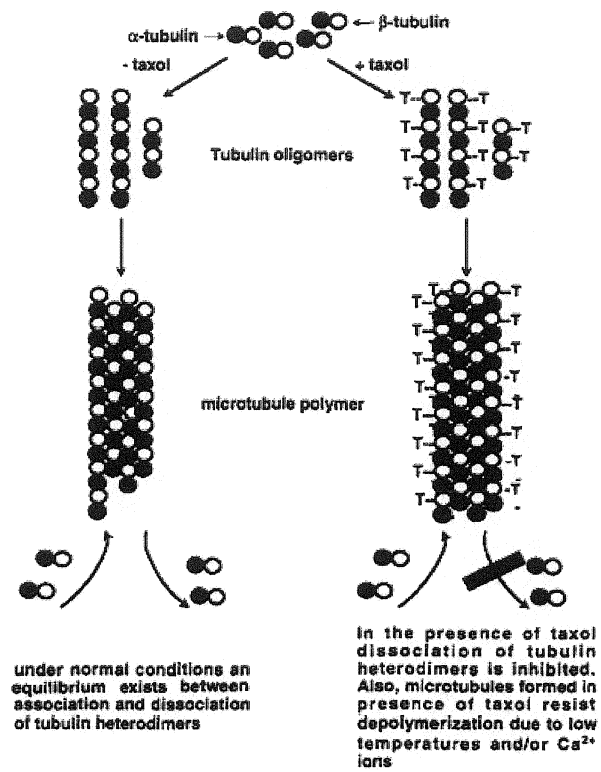
cellule, à la signalisation intracellulaire et à la division cellulaire et sont composés de dimères de tubulines (JORDAN et WILSON, 2004). La liaison de drogues inhibitrices de la dynamique des microtubules avec la tubuline affectera la polymérisation ou la dépolymérisation des microtubules et empêchera les processus cellulaires importants dans lesquels ils sont impliqués. Entre autres, le fuseau mitotique ne sera plus compétent au cours de la mitose, ce qui aura pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire et l'empêchement de la division de la cellule cancéreuse traitée (HERBST et KHURI, 2003; AGARWAL et KAYE, 2003).

### 3.2 Les drogues liant l'ADN

Les drogues qui lient l'ADN sont elles-aussi divisées en différentes sous-catégories. On y retrouve entre autres les anthracyclines, dont fait partie la doxorubicine, les agents alkylants, comme la cyclophosphamide et le chlorambucil, ainsi que les composés platinum, comme le cisplatine et le carboplatine (KALIL et McGUIRE, 2002; GEFFEN et MAN, 2002; AGARWAL et KAYE, 2003). Ces drogues, en liant ou en modifiant l'ADN, emmènent une accumulation de dommages à l'ADN. La cellule, ne pouvant survivre, entre en apoptose (NORBURY et ZHIVOTOVSKY, 2004; SIDDIK, 2003). Les agents alkylants ont leurs effets cytotoxiques en liant l'ADN de manière covalente (GEFFEN et MAN, 2002). D'un autre côté, les anthracyclines ont plusieurs modes d'action, dont l'intercalation dans les paires de bases de la double hélice d'ADN et l'inhibition de la topoisomérase II (DORR et

**Figure 2. Mécanisme d'action du taxol (Tiré PAREKH et SIMPKINS, 1997).**

La façon dont le taxol amène les cellules à la mort cellulaire programmée suite à l'arrêt du cycle cellulaire n'est pas totalement caractérisée. Des groupes ont émis l'hypothèse que le taxol induit l'apoptose en activant la caspase-3 de manière caspase-10 dépendante et caspase-9 indépendante (CHEN et al, 2005; PARK et al, 2004). D'autres groupes ont démontré que le taxol induit la phosphorylation de Bcl-2 dans des cellules en monocouche et que l'apoptose qui s'ensuit est AIF-dépendante et caspase-indépendante (MAKHIJA et al, 1999; AHN et al, 2004). Il a aussi été démontré que Bim, un homologue pro-apoptotique lié aux microtubules, est relâché lorsque ces dernières sont déstabilisées par les drogues (AGARWAL et KAYE, 2003).



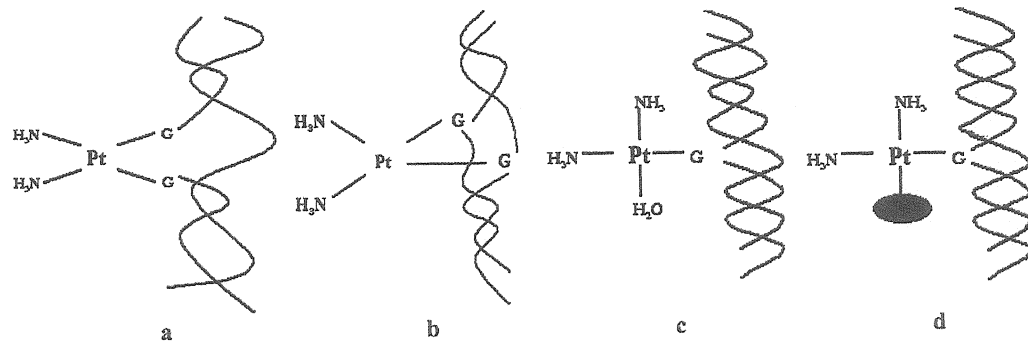
VonHOFF, 1994; GEFFEN et MAN, 2002). Finalement, les composés platinum se lient de manière covalente de plusieurs manières avec l'ADN.

Prenons l'exemple du cisplatine, qui est l'une des drogues de chimiothérapie les plus utilisées dans le traitement des cancers épithéliaux. Le cisplatine est tout d'abord activé par hydrolyse dans la cellule, puis réagit ensuite avec l'ADN dans le noyau de la cellule (BOULIKAS et VOUGIOUKA, 2003). La figure 3 montre les différents produits formés par la réaction du cisplatine avec l'ADN, les liens intrabrins étant le type de lésion majoritairement responsable de la cytotoxicité du cisplatine (SIDDIK, 2003; BOULIKAS et VOUGIOUKA, 2003). Ces réactions auront pour effet d'inhiber la réplication et la transcription et d'arrêter la croissance tumorale (BOULIKAS et VOUGIOUKA, 2003). Globalement, le cisplatine induit l'apoptose par la modification du ratio entre l'homologue pro-apoptotique Bax, dont l'expression est induite, et l'homologue anti-apoptotique Bcl-2, dont les niveaux sont diminués. Malgré que la voie mitochondriale demeure la voie apoptotique induite par le cisplatine la plus documentée, l'apoptose induite par le cisplatine peut aussi être effectuée via la voie extrinsèque. Lors d'un traitement au cisplatine, la voie Fas/FasL est activée suite à la reconnaissance des dommages à l'ADN causés par le cisplatine. La caspase-8 est ensuite activée, suivie de la caspase-3, ce qui enclenchera une boucle d'amplification du signal apoptotique et la mort de la cellule (BOULIKAS et VOUGIOUKA; 2003; SIDDIK, 2003).

**Figure 3. Produits de réaction du cisplatine avec l'ADN.**

La forme hydrolysée activée du cisplatine réagit avec l'ADN et les protéines cellulaires. Ces réactions produisent des liaisons intra-brins et inter-brins. De plus, le cisplatine peut lier l'ADN avec l'un de ces groupements réactifs, et l'autre peut demeurer libre ou se lier à une protéine (BOULIKAS et VOUGIOUKA, 2003).





### 3.3 Les drogues inhibitrices de l'enzyme topoisomérase

Les enzymes de la famille des topoisomérases catalysent des changements topologiques dans l'ADN qui sont importants pour la réplication de l'ADN, la ségrégation des chromosomes, la transcription, la recombinaison et l'organisation de la chromatine (AUSTIN et MARSH, 1998). Les drogues inhibant ces enzymes comprennent entre autres le Topotecan et l'étoposide (GEFFEN et MAN, 2002; AGARWAL et KAYE, 2003). L'étoposide affecte la topoisomérase II $\beta$ , tandis que le Topotecan affecte la topoisomérase II (AUSTIN ET MARSH, 1998; TOLIS et al, 1999). Une fois que la drogue a inhibé la topoisomérase, il y a formation et l'accumulation de cassures double brin dans l'ADN. Les processus cellulaires importants dépendants de cet enzyme sont donc empêchés et ceci mène à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose (GEFFEN et MAN, 2002).

### 3.4 La résistance à la chimiothérapie

La résistance aux drogues de chimiothérapie est responsable, dans 90% des cas, de la mort des patientes atteintes de cancer de l'ovaire de stades métastatiques. Beaucoup de mécanismes de résistance ont été développés par les cellules. Premièrement, la pharmacocinétique chez les patientes peut être affectée : la concentration effectrice de drogue n'est alors pas celle d'un traitement optimal. Ceci dépend de la vascularisation de la

tumeur, de l'élimination par le rein et le foie, de l'efficacité de conversion de la pro-drogue en drogue, etc. Deuxièmement, la résistance peut aussi provenir de modifications dans le micro-environnement de la cellule. Troisièmement, la résistance à la chimiothérapie peut être due à des raisons cellules-spécifiques : état quiescent, transport membranaire de la drogue, pompage de la drogue hors de la cellule, changement d'affinité de liaison de la drogue avec sa cible, réparation de l'ADN (AGARWAL et KAYE, 2003, SIDDIK, 2003).

#### 4. Marqueurs du cancer de l'ovaire

Plusieurs marqueurs du cancer épithélial de l'ovaire ont été identifiés par l'utilisation de différentes méthodes dont la spectrométrie de masse et les biopuces à ADN (LU et al, 2004; SCHUMMER et al, 1999; ZHANG et al, 2005). Parmi ceux-ci, notons la laminine, l'ostéopontine, BMP-7, la mésothéline, les claudines-3 et -4, les kallikréines 6, 8 et 10 et les mucines MUC-1 et CA125 (DEVINE et al, 1992; KISHI et al, 2003; FLEMMING et al, 2005). Les différentes mucines sont d'ailleurs des marqueurs chez plusieurs autres types de cancer, dont les adénocarcinomes colorectaux et du pancréas (MEYER et RUSTIN, 2000; HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004; BYRD et BRESALIER, 2004).

#### 4.1 Les mucines

Les mucines sont définies comme de larges protéines membranaires ou extracellulaires qui sont hautement glycosylées d'oligosaccharides complexes, qui établissent une barrière moléculaire sélective à la surface des épithéliums et qui engagent des signaux de transduction (CARRAWAY et al, 2002; DEKKER et al, 2002; HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Le poids des mucines est en moyenne de 50% à 90% composé de glycosylations, majoritairement des O-glycosylations liées à des sérines ou des thréonines (BYRD et BRESALIER, 2004, HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). La famille des mucines regroupe des glycoprotéines qui n'ont pas nécessairement d'homologies de séquence entre elles (DEKKER et al, 2002).

Les mucines sont grossièrement divisées en deux groupes : les mucines sécrétées et les mucines associées à la membrane. À ce jour, une vingtaine de mucines ont été répertoriées (HIGUSHI et al, 2004a; HIGUSHI et al, 2004b). Les mucines sécrétées sont surtout situées aux interfaces aérodigestives des épithéliums et servent à protéger cette surface et à contrôler le micro-environnement des cellules (PEREZ-VILAR et HILL, 1999; HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Les mucines membranaires ont des rôles additionnels grâce à leurs domaines transmembranaire et cytoplasmique qui leur permettent d'effectuer la transduction de signaux importants entre autres pour la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose et la sécrétion. Le domaine extracellulaire de certaines mucines telles que MUC1 et MUC4 peut aussi être relâché sous forme soluble par

protéolyse ou par épissage alternatif. La séparation des domaines transmembranaire et cytoplasmique s'effectue dans le domaine SEA (CARRAWAY et al, 2003, HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Une des caractéristiques majeures des mucines est la présence dans leur domaine extracellulaire de répétitions en tandem de séquences identiques ou similaires, riches en sérines, prolines et thréonines. La séquence et le nombre de répétitions varient d'une mucine à l'autre et d'un individu à l'autre (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004; FOWLER et al, 2003). Ces domaines créent des sites denses de glycosylations et de structures protéiques spécifiques (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004).

Les mucines ont des fonctions essentielles dans un contexte normal, mais contribuent aussi à la tumorigénèse. Dans ce dernier cas, l'expression des mucines est souvent modifiée: certaines mucines sont surexprimées, comme MUC1 dans le cancer colorectal, et d'autres voient leur expression fortement diminuée, comme MUC2 dans certains types de cancers colorectaux (BYRD et BRESALIER, 2004). Certaines mucines transmembranaires, telles que MUC1 et MUC4, permettent une signalisation intracellulaire via leur queue cytoplasmique ou leur action de ligand intramembranaire, respectivement, et ont une implication importante dans la tumorigénèse (JEPSON et al, 2002; WEN et al, 2003; HUANG et al, 2005).

#### 4.1.1 La mucine MUC1

MUC1, une mucine transmembranaire, est un marqueur du cancer du colon et du sein (BYRD et BRESALIER, 2004; BEATTY et al, 2001; TAYLLOR-PAPADIMITRIOU et al, 1999). L'expression de MUC1 est ubiquitaire et normalement polarisée à la surface apicale des cellules épithéliales (BRAYMAN et al, 2004, HANISCH et MÜLLER, 2000). Par contre, dans le contexte d'un cancer, il y a perte de polarité et augmentation de l'expression de MUC1 associées à une croissance ancrage-indépendante et à une augmentation de la tumorigénicité (Li et al, 2003, Ren et al, 2002). De même, il y a augmentation de la relâche de la forme soluble de MUC1 et sa glycosylation est modifiée, découvrant de nouveaux épitopes du squelette peptidique (HANISCH et MÜLLER, 2000; vonMENSdorff-POUILLY et al, 2000; KARSTEN et al, 2005).

L'ARN de MUC1 est épissée alternativement et a plusieurs transcrits alternatifs connus. Parmi ceux-ci, on retrouve MUC1/Y, un ARNm de MUC1 tronqué de tout le domaine des répétitions. La protéine tronquée résultante aurait une activité de récepteur et de signalisation (vonMENSdorff-POUILLY et al, 2000). Un autre variant alternatif est MUC1/SEC, une forme sécrétée qui ne contient pas les domaines transmembranaire et cytoplasmique (HANISCH et MÜLLER, 2000; BRAYMAN et al, 2004). La forme sécrétée de MUC1 peut aussi être relâchée par coupure protéolytique. L'enzyme impliquée dans la relâche de MUC1 serait la sheddase TACE/ADAM17 (BRAYMAN et al, 2004; LILLEHOJ et al, 2003; THATHIAH et al, 2003).

MUC1 interagit avec différentes protéines dont EGFR, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -caténine, Grb2, Sos/Ras, c-Src, PKC $\delta$ , HSP-70 et HSP-90 (PANDEY et al, 1995; LI et al, 1998; SCHROEDER et al, 2001; REN et al, 2002, WEN et al, 2003; REN et al, 2005). Lorsque qu'il y a stimulation des cellules à l'EGF, il y a interaction du domaine extracellulaire de MUC1 avec EGFR (SCHROEDER et al, 2001). D'autre part, la GSK3 $\beta$  phosphoryle MUC-1 lors de leur interaction et diminue ainsi la liaison de MUC1 avec la  $\beta$ -caténine. Ceci est associé avec la restauration de l'interaction  $\beta$ -caténine-E-cadhérine, et donc des jonctions cellulaires adhérentes (Li et al, 1998). Par contre, la surexpression de MUC1 entraîne une stabilisation de la  $\beta$ -caténine et augmente les niveaux nucléaires de cette protéine durant la destruction des jonctions cellulaires. La queue cytoplasmique de MUC1 est d'ailleurs détectée au noyau, couplée avec la  $\beta$ -caténine, et servirait de co-activateur de la transcription (WEN et al, 2003; HUANG et al, 2005). MUC1 pourrait promouvoir la transformation des cellules, en partie en bloquant la phosphorylation et la dégradation de la  $\beta$ -caténine (HUANG et al, 2005). De plus, le C-terminal de la protéine MUC1 transloque au noyau après une stimulation des cellules à l'EGF. Une stimulation des cellules à l'héréguline entraîne quant à elle une translocation du domaine C-terminal de MUC1 à la mitochondrie et au nucléole. Dans ce dernier cas, la  $\gamma$ -caténine est transloqué au nucléole avec le domaine C-terminal de MUC1. Cette translocation de la région C-terminal de MUC1, qui s'effectue dans un contexte tumoral, serait médiée en partie via l'activation de la voie ErbB-c-Src et par les chaperonnes HSP-70 et HSP-90 (REN et al, 2005; REN et al, 2004; LI et al, 2003). La présence de MUC1 à la mitochondrie corrèle avec le fait qu'elle confère une résistance aux agents génotoxiques. En effet, MUC1 atténue la réponse apoptotique mitochondriale induite par les drogues créant des dommages à l'ADN telles que le cisplatine et l'étoposide. MUC1

bloque aussi l'apoptose induite par la molécule TRAIL, ce qui indique une implication de MUC1 dans les deux voies apoptotiques (REN et al, 2004).

MUC1 est aussi impliquée dans la régulation des niveaux intracellulaires d'oxydants et dans la réponse apoptotique aux stress oxydatifs. En fait, le domaine C-terminal MUC1 atténue les niveaux des ROS dans la cellule en augmentant les niveaux d'enzymes anti-oxydants et en activant le facteur de transcription FOXO3a. MUC1, en atténuant la voie AKT, et donc la phosphorylation de FOXO3a, permet à FOXO3a de transcrire des gènes de protéines impliquées dans la réponse aux stress oxydatifs. Donc, MUC1 régule cette voie de signalisation dans le but d'une réponse de survie face à ce genre de stress (YIN et al, 2004; YIN et al, 2003). Une autre étude a démontré que MUC1 active les voies PI3K/AKT et Bcl-xL et atténue la voie mitochondriale de l'apoptose lors de la transformation induite par MUC1 chez des fibroblastes normaux (RAINA et al, 2004).

Finalement, MUC1 a un rôle à jouer dans l'immunité puisqu'elle participe à la stimulation de l'expansion des certaines cellules T (WAJCHMAN et al, 2004). De plus, une répression de MUC1 est observée dans la transition épithélium-méenchyme induite par Snail dans des cellules tumorales (GUAITA et al, 2002).



## 5. CA125

### 5.1 Historique

CA125 est une protéine encodée par le gène de la mucine MUC16 (YIN et LLOYD, 2001). Il a été détecté pour la première fois en 1981 par le groupe du Dr Bast à l'aide de l'anticorps monoclonal OC125 généré en utilisant la lignée cellulaire humaine de carcinome séreux de l'ovaire OVCA 433. À l'époque, cet anticorps a montré une réaction avec un déterminant antigénique exprimé sur plus de 80% des tumeurs épithéliales ovariennes non-mucineuses. Cet épitope s'est ensuite avéré faire partie de CA125 (BAST et al, 1981; KABAWAT et al, 1983).

### 5.2 Importance clinique de CA125

CA125 n'est pas exclusivement exprimé par l'épithélium cancéreux de l'ovaire. Par contre, il est indétectable dans l'épithélium de l'ovaire normal et a une demi-vie relativement courte, ce qui en fait un bon candidat en tant que marqueur clinique (MARTH et al, 1992; GUPPY et RUSTIN, 2002; WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Un test ELISA utilisant deux anticorps dirigés contre CA125 a été établi afin de mesurer les taux de CA125

sériques en clinique (BAST et al, 1983; WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Généralement, en situation normale, la concentration de CA125 sérique peut atteindre jusqu'à 35 unités/ml (MARKMAN, 1997; WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Dans plus de 80% des cas de cancers non-mucineux de l'épithélium de l'ovaire, CA125 est plus élevé que les taux de base (BAST et al, 1981). Le suivi des patientes atteintes de ce type de cancer est fait par un dosage régulier de leur CA125 sérique. Dès le moment du diagnostique, tout le long du traitement et lors de la rémission, le CA125 sérique est dosé afin d'avoir un indice sur l'état de la maladie. Une diminution des taux de CA125 sérique dénote une régression de la tumeur. Une concentration sérique de CA125 stable corrèle habituellement avec la stabilité de la tumeur. Finalement, une concentration de CA125 sérique élevée résulte d'une rechute ou d'une tumeur qui progresse et ne répond pas au traitement (BAST et al, 1983). Environ 90% de la totalité des cas de cancer de l'ovaire peuvent être détecté par dosage sérique de CA125 (WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Par contre, dans plusieurs cas répertoriés, une augmentation du CA125 sérique n'est pas toujours associée avec un cancer de l'ovaire et c'est pourquoi CA125 est un marqueur de progression du cancer épithélial de l'ovaire, et non un outil diagnostique. Une élévation du CA125 sérique est observée dans plusieurs conditions normales ou bénignes telles que lors d'une grossesse, à certains moments du cycle menstruel, lors d'une tuberculose, d'une cirrhose, d'une péritonite infectieuse, d'une endométriose ou de kystes ovariens. Une élévation du CA125 sérique est également observée chez des patients atteints de tumeurs malignes non-ovariennes telles lors d'un cancer gastro-intestinal, de l'utérus ou du sein (BERCHUCK et al, 1989; MARKMAN, 1997; MEDEN et FATTAHI-MEIBODI, 1998; BAST et al, 1997; GINATH et al, 2002). Dans le même ordre d'idée, certaines personnes

atteintes d'un cancer épithélial séreux de l'ovaire ne présente pas ou très peu d'élévation du CA125 sérique par rapport aux niveaux normaux basaux. Ceci est contraire à la tendance générale où une augmentation du CA125 sérique est habituellement observée chez les patientes atteintes de ce type histologique de cancer de l'ovaire (MENCZER et al, 1997; WILDER et al, 2003). De plus, les dosages du CA125 sérique ne détectent que 50% des cas de tumeurs de l'ovaire de stades précoces, ce qui confirme son faible potentiel diagnostique (MARKMAN, 1997).

### 5.3 Le gène de CA125

Le gène MUC16 encodant la protéine CA125 est situé au locus p13.2 du chromosome 19 et inclut le plus gros exon de ce chromosome (KANEKO et al, 2003; GRIMWOOD et al, 2004). C'est le groupe du Dr Lloyd qui a identifié le gène MUC16 comme celui encodant CA125 en clonant un ADNc partiel qui équivalait à 1890 aa (YIN et al, 2001; YIN et al, 2002). Cette séquence est relativement riche en prolines, thréonines et sérines, mais toutefois moins que la plupart des mucines. De plus, cette séquence comprend neuf répétitions en tandem de 156 aa chacune, et un C-terminal non-répétitif de 537 aa. Cette dernière région regroupe un domaine cytoplasmique de 31 aa contenant un site consensus de phosphorylation sur une tyrosine et un domaine hydrophobe de 25 aa, possiblement transmembranaire. Les répétitions en tandem ne sont pas identiques entre elles mais ont chacune deux cystéines conservées. Dans ces répétitions, on retrouve cinq des six domaines

SEA retrouvés dans le gène de CA125. Plusieurs sites potentiels de glycosylations ont aussi été identifiés dans la portion extracellulaire de la protéine (YIN et al, 2001; YIN et al, 2002).

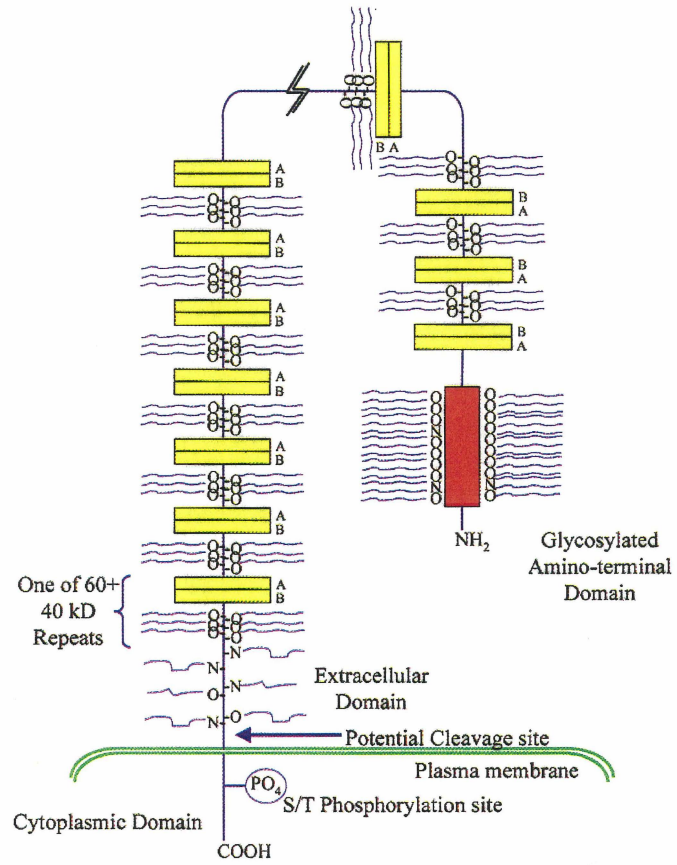
Cependant, à l'époque où le groupe de Lloyd a identifié le gène MUC16, le groupe du Dr O'Brien avait déjà proposé un modèle de la structure de CA125, sans toutefois le cloner. Selon ce groupe, la protéine CA125 serait constituée de 22 152 aa, soit plus du double de ce qui a été proposé par Lloyd. Cette structure est illustrée à la figure 4 (O'BRIEN et al, 2001; O'BRIEN et al, 2002). Dans ce cas-ci, CA125 comporte aussi un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique, ainsi que plusieurs sites de glycosylation, surtout des glycosylations liées en O. La séquence diffère majoritairement de celle de Dr Lloyd par ses plus de 60 répétitions en tandem de 156 aa et par son domaine N-terminal qui comporterait plus de 12 068 aa. Les épitopes des anticorps dirigés contre CA125 se trouveraient dans une boucle créée par les cystéines conservées présentes dans chaque répétition. Les anticorps contre CA125 sont divisés en deux groupes : les OC125-like (groupe A) et les M11-like (groupe B) (NUSTAD et al, 1996). Des sites potentiels pour l'épissage alternatif permettent l'expression des variants alternatifs. De plus, des domaines SEA sont aussi retrouvés dans la séquence de MUC16 (O'BRIEN et al, 2001; O'BRIEN et al, 2002; MAEDA et al, 2004).

Finalement, une partie de CA125, nommée FLJ14303 (AK024365), a été clonée et contient les domaines cytoplasmique, transmembranaire, unique (domaine extracellulaire entre les répétitions et le domaine transmembranaire) et trois répétitions en tandem de CA125 (HOVIG et al, 2001).

**Figure 4. Structure hypothétique de CA125 proposée par le groupe de O'Brien.**

On y retrouve les domaines cytoplasmique, transmembranaire, unique, les répétitions en tandem et le N-terminal. On y trouve aussi l'emplacement d'un site de phosphorylation potentiel, de même que des sites de glycosylations potentiels évoqués par des N et O. Les boîtes A et B sont les épitopes des deux types d'anticorps dirigés contre CA125 (O'Brien et al, 2001).

Proposed Structure of CA125



#### 5.4 Caractéristiques et expression de CA125

CA125 est détecté dans plusieurs tissus et liquides biologiques normaux tels que le lait, le sang, la conjonctive et l'épithélium des poumons, du sein, de l'utérus et des trompes de Fallope (BARBATI et al, 1990; GUPPY et RUSTIN, 2002; WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Selon une analyse d'immunobuvardage de type Western, le poids moléculaire de CA125 est de plus de 250 kDa, (O'BRIEN et al, 2002). Ce poids est à 24% constitué de glycosylations, ce qui n'est pas typique d'une mucine (> 50%) (DAVIS et al, 1986). Ces glycosylations seraient surtout liés en O comme chez la plupart des mucines mais, des N-glycosylations seraient aussi présentes en nombre significatif, ce qui n'avait initialement pas été rapporté (LLOYD et al, 1997; KUI WONG et al, 2003).

Plusieurs facteurs modulent l'expression et la relâche de CA125. L'augmentation de l'expression et de la relâche de CA125 est associée à la phase Go/G1 du cycle cellulaire et à un niveau de confluence moyen de cellules en culture (MARTH et al, 1998). L'interféron  $\gamma$  stimule la production et la sécrétion de CA125 des cellules de cancer de l'ovaire (MARTH et al, 1989). Le TNF- $\alpha$  et l'interleukine-1 $\beta$  régule à la baisse la relâche de CA125 chez des cellules mésothéliales péritonéales. Le TGF- $\beta$ , quant à lui, réduit l'expression de CA125 en même temps que la prolifération des cellules de cancer de l'ovaire tandis que le TGF- $\alpha$  stimule l'expression et la sécrétion de CA125 sans stimuler la prolifération cellulaire. Les glucocorticoïdes modulent aussi les niveaux sériques de CA125 (MARTH et al, 1998). Finalement, le facteur de croissance EGF augmente aussi la sécrétion de CA125 et cette

relâche serait associée avec la phosphorylation de CA125 sur un résidu tyrosine par EGFR (KONISHI et al, 1994; FENDRICK et al, 1997).

## 5.5 Rôles de CA125

Très peu d'information est connue quant aux rôles de CA125. Par contre, dans la littérature, deux partenaires d'interaction de CA125 ont été identifiés, donnant ainsi des pistes sur les fonctions de la protéine. Premièrement, une interaction directe entre CA125 et la galectine-1 a été démontrée par colonne d'affinité suivie d'une analyse de spectrométrie de masse (SEELNMEYER et al, 2003). Les galectines sont une famille de protéines de type lectine liant les sucres  $\beta$ -galactoside présents dans les glycosylations (BARONDES et al, 1994; HUGUES, 1997). Elles sont entre autre impliquées dans la modulation de l'adhésion, de la prolifération et de la mort cellulaire et dans le processus métastatique (DANGUY et al, 2002; PERILLO et al, 1998). L'interaction de la galectine-1 avec CA125 suggère une implication de cette dernière dans la liaison de la matrice extracellulaire. Deuxièmement, le domaine de répétitions de CA125 a été repêché lors d'une sélection parmi une banque d'ADNc de lignées cellulaires liant la mésothéline. La mésothéline est exprimée entre autres par les cellules de cancer de l'ovaire et les cellules mésothéliales. L'interaction CA125-mésothéline contribuerait à l'attachement des cellules de cancer de l'ovaire aux cellules mésothéliales lors du processus métastatique (RUMP et al, 2004).



Dans le laboratoire des interactions ont été démontrées par co-immunoprécipitation entre CA125 et la  $\beta$ -caténine et la E-cadhérine, des protéines impliquées entre autres dans la progression du cancer du sein (COWIN et al, 2005). De plus, par double-hybride chez la levure, des interactions de la queue cytoplasmique de CA125 avec RNF5 et avec une des protéines composant la sous-unité F0/F1 de l'ATP-synthase ont été démontrées (données non-publiées). L'ATP-synthase est une protéine mitochondriale qui a initialement été identifié lors d'un criblage de gènes de susceptibilité aux radiations (TSUJI et al, 2005). De plus, la fonction de cette protéine est indirectement modulée par certains homologues Bcl-2 et est essentielle à la voie mitochondriale de l'apoptose (GREEN et REED, 1998). La RNF5 est une protéine à motif "ring finger" et est un modulateur de la motilité cellulaire par son action sur la paxilline (DIDIER et al, 2003; MATSUDA et al, 2001).

## 5.6 Modèle d'étude de CA125 établi dans le laboratoire

Dans le laboratoire, un modèle d'étude de CA125 a été établi. Cet outil consiste en des lignées cellulaires stables, dérivées de la lignée de cancer de l'ovaire NIH :OVCAR-3, dont l'expression de CA125 à la surface des cellules est empêchée, ce qui imite un "knockdown" de CA125. Ces clones stables expriment un mini-anticorps monovalant modifié, ou scFv, dirigé contre CA125 et ce scFv a un signal de sécrétion ainsi qu'un peptide KDEL de rétention au réticulum endoplasmique. Lorsque les cellules expriment CA125, cette protéine doit passer par la voie de sécrétion puisque c'est une protéine membranaire

glycosylée. En passant au RE, CA125 est séquestré à cette organelle par le scFv et sa localisation naturelle à la membrane est empêchée. La figure 5 montre l'expression de CA125 de la lignée parentale NIH :OVCAR-3 et des clones stables exprimant un scFv (BEAUDIN, 2003).

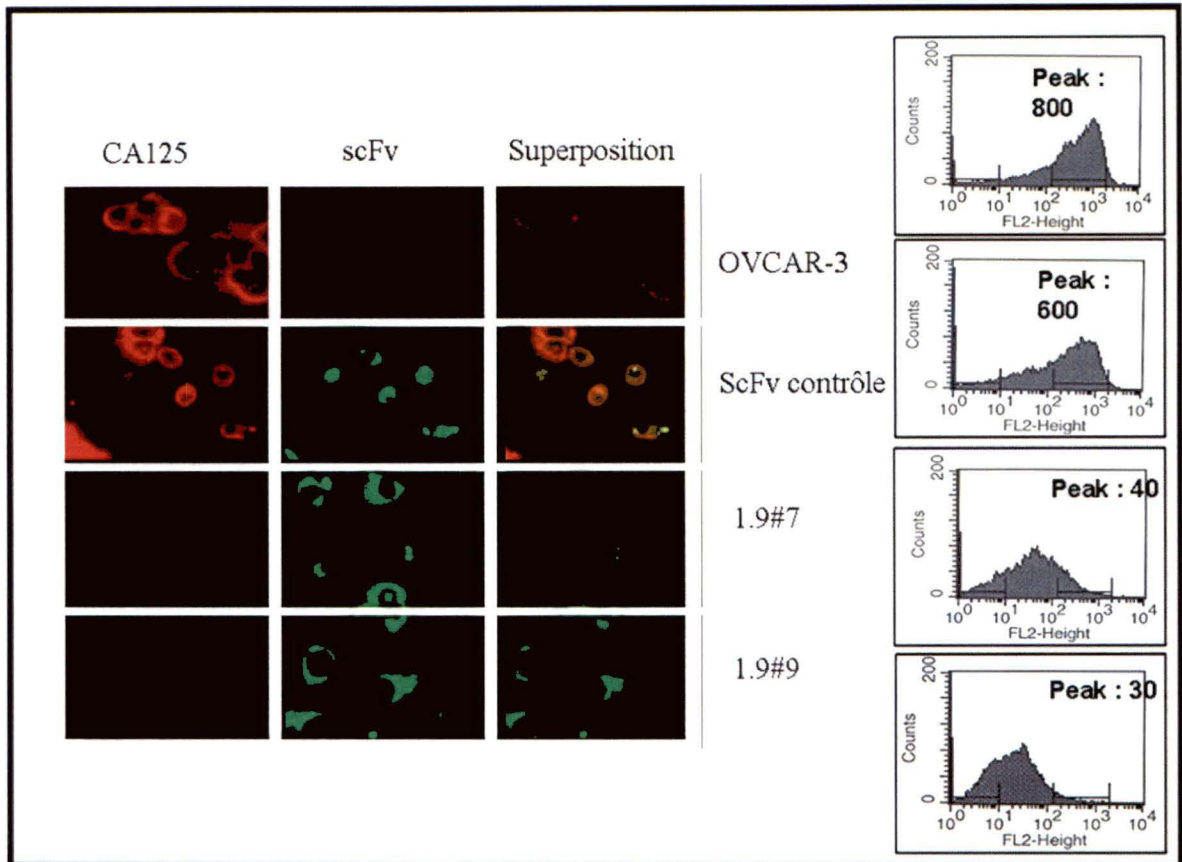
Donc, à l'aide de ces clones, une étude de perte de fonction de CA125 est possible. Les clones n'ayant plus CA125 à la membrane sont nommés 1 :9 #7 et 1 :9#9, ou clones CA125-knockdown, tandis que le clone contrôle exprimant un scFv ne liant pas CA125 est appelé le clone scFv contrôle. Ces clones ont été décrits et caractérisés en détail dans le mémoire de Julie Beaudin (BEAUDIN, 2003).

#### 5.6.1 Fonctions de CA125 démontrées avec les clones exprimant un scFv anti-CA125

Ces clones stables CA125-knockdown ont permis de cibler certains rôles potentiels de CA125. La perte de CA125 à la membrane des cellules entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire, une perte d'adhésion cellule-cellule, une perte de tumorigénicité et une augmentation de la migration cellulaire (BEAUDIN, 2003; PINARD, 2005). De plus, ces clones semblent plus sensibles à TRAIL et au FasL. De même, les cellules n'exprimant plus CA125 à la membrane sont plus sensibles à la lyse par les cellules NK (données non-publiées). Les cellules NK remplissent une fonction d'immunosurveillance où le caractère malin d'une cellule tumorale induit la reconnaissance de cette dernière et entraîne sa lyse par

### **Figure 5 : Validation des clones CA125-knockdown.**

Ces clones stables sont dérivés de la lignée de cancer de l'ovaire OVCAR-3. Les clones 1 :9 #9 et 1 :9 #7 expriment un scFv ayant un signal de sécrétion et un signal de rétention au RE qui empêche la localisation naturelle de CA125 à la membrane plasmique. La diminution de l'expression de surface de CA125 a été validée par immunofluorescence indirecte sur lame avec des cellules perméabilisées et par cytométrie de flux avec des cellules non-perméabilisées. À l'aide de l'immunofluorescence, on peut voir que la présence du scFv (en vert) dans les clones 1 :9 #9 et 1 :9 #7 diminue grandement l'expression de CA125 (en rouge), contrairement à ce qu'on peut observer chez les cellules OVCAR-3 et scFv contrôle, le clone contrôle exprimant un scFv ne liant pas CA125. La diminution de l'expression de CA125 est confirmée par l'analyse de cytométrie de flux (BEAUDIN, 2003). Les pics de fluorescence correspondant à l'expression de surface de CA125 sont situés entre 600 et 800 pour ce qui est du clone contrôle et de la lignée parentale OVCAR-3. Pour les clones stables exprimant le scFv dirigé contre CA125, les pics de fluorescence se situent entre 30 à 40. Donc, l'expression par les cellules d'un scFv dirigé contre CA125 entraîne une diminution importante de l'expression de surface de CA125.



les cellules NK (LODISH et al, 1997). La présence de CA125 à la membrane des cellules tumorales pourrait empêcher la reconnaissance des cellules-ci par les cellules NK et ainsi permettre leur évaison du système immunitaire. Certains types de glycosylations reconnus pour leur implication dans la modulation de la réponse immunitaire ont d'ailleurs été retrouvés sur la protéine CA125 de la lignée de cancer de l'ovaire OVCAR-3 sont (WONG et al, 2003).

## 6. Hypothèse et objectifs

La chimiothérapie est basée sur le principe que les cellules cancéreuses se divisent généralement plus vite que les cellules normales. Les agents chimiothérapeutiques sont tous créés de façon à affecter préférentiellement les cellules tumorales à prolifération rapide. De plus, dans le laboratoire, il a été noté que les clones CA125-knockdown prolifèrent plus vite que les lignées contrôles. Après cette observation, nous nous sommes posé la question à savoir si CA125 pouvait affecter la sensibilité des cellules de cancer de l'ovaire aux agents utilisés en chimiothérapie. Des expériences préliminaires effectuées dans le laboratoire ont suggéré que les clones CA125-knockdown sont plus sensibles au cisplatine que les cellules contrôles, et qu'il n'y a pas de différence de sensibilité au taxol (BEAUDIN, 2003). Ces résultats semblent indiquer que la diminution de l'expression de surface de CA125 entraînerait une spécificité de sensibilité aux agents génotoxiques, c'est à dire les drogues qui affectent l'ADN.

Notre hypothèse était que CA125 pourrait avoir un rôle protecteur contre l'apoptose induite par les agents génotoxiques. Notre objectif principal était donc de déterminer si CA125 a un rôle à jouer dans la sensibilité des cellules de cancer de l'ovaire aux agents génotoxiques. Pour ce faire, les clones CA125-négatifs à la surface cellulaire et leurs contrôles ont été utilisés afin d'effectuer des tests de sensibilité à différentes drogues utilisées en chimiothérapie du cancer de l'ovaire.

De plus, des essais d'identification de partenaires d'interactions de CA125 ont été effectués afin de cibler les voies dans lesquelles CA125 pourrait être impliqué et ainsi tenter d'expliquer les phénotypes observés avec les clones stables CA125-négatifs à la surface cellulaire. Des immunoprécipitations de CA125 endogène dans la lignée de cancer de l'ovaire NIH :OVCAR-3 ainsi que la technique du TAP ont été réalisées afin d'atteindre cet objectif.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 7. Culture cellulaire

La lignée NIH : OVCAR-3 (ATCC, Manassas, VA) est une lignée cellulaire humaine dérivée de l'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome séreux de l'ovaire. Cette lignée est maintenue en culture dans un milieu RPMI 1640 (Wisent, St-Bruno, Canada) supplémenté de 4mM de L-glutamine (Wisent, St-Bruno, Canada), 0.01 mg/ml d'insuline (Sigma, Saint-Louis, Missouri), 20% de FBS (Wisent, St-Bruno, Canada), 100 U/ml de pénicilline (Wisent, St-Bruno, Canada), 100 µg/ml de streptomycine (Wisent, St-Bruno, Canada) et 2.5 µg/ml d'amphotéricine B (Wisent, St-Bruno, Canada). Les clones stables 1 :9 #9, 1 :9 #7 et scFv contrôle dérivés de la lignée parentale NIH : OVCAR-3 sont maintenus en culture de la même manière que cette dernière, à l'exception qu'ils sont toujours en présence de 1 µg/ml de doxycycline (Sigma, Saint-Louis, Missouri) et 1 µg/ml de blasticidine (CN Biosciences, San Diego, CA). Ces deux drogues servent respectivement à induire la production du scFv et à faire une pression de sélection pour ne conserver que les clones stables ayant intégrés l'ADN contenant la séquence du scFv.

La lignée SKOV-3 (ATCC, Manassas, VA) est une lignée cellulaire humaine provenant de l'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome séreux de l'ovaire. Cette lignée est maintenue en culture dans un milieu DMEM/F12 (Wisent, St-Bruno, Canada) supplémenté

de 4mM de L-glutamine, 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2.5 µg/ml d'amphotéricine B.

La lignée COS-7 (ATCC, Manassas, VA) est une lignée cellulaire de fibroblastes de rein de singe transformés avec l'antigène de SV-40. Cette lignée est maintenue en culture dans un milieu DMEM supplémenté de 4mM de L-glutamine, 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2.5 µg/ml d'amphotéricine B.

Les cellules sont conservées dans un incubateur maintenant un environnement avec une température de 37°C et une concentration de CO<sub>2</sub> de 5%. Le passage des cellules a été effectué de une à deux fois par semaine, selon un ratio de 1 :3 pour NIH-OVCAR-3 et de 1 :10 pour SKOV-3 et COS-7. Lors d'un passage, le milieu conditionné des cellules a tout d'abord été retiré du contenant. Les cellules ont ensuite été lavées avec 5 ml de PBS 1X (Wisent, St-Bruno, Canada) stérile puis décollées du plastique avec de l'EDTA 0.53mM (Wisent, St-Bruno, Canada) ou de la trypsine 0.05% avec EDTA 0.53mM (Wisent, St-Bruno, Canada) lors d'une incubation à 37°C d'une durée allant de 2 à 10 minutes. Par la suite, les cellules ont été récoltées dans un tube conique avec 5 ml de milieu complet et centrifugées à 4°C pendant 5 minutes à 1000 rpm avec une centrifugeuse Labofuge 400R (VWR, Montréal, Canada). Le surnageant a ensuite été retiré du tube et le culot de cellules a été resuspendu afin d'être divisé entre les contenant de culture cellulaire T-75 (BD Falcon, Bedford, MA), selon le ratio de passage des lignées, avec 10 ml de milieu complet par contenant.



### 7.1 Traitement des cellules au cisplatine

Pour les expériences nécessitant une quantité importante de cellules traitées avec le cisplatine (Mayne Pharma, Montréal, Canada), des cellules ont étéensemencées dans des contenants T-75 ou des plaques 6 puits (BD Falcon, Bedford, MA). Le lendemain, une fois les cellules adhérentes, le milieu a été retiré et remplacé par du milieu frais contenant le cisplatine. Les cellules ont ensuite été lysées 24 à 96 heures plus tard ou employées pour une expérience subséquente.

### 8. Mesure de la sensibilité aux agents génotoxiques par essai XTT

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 96 puits (BD Falcon, Bedford, MA), à raison de 10 000 cellules par puits pour la lignée SKOV-3 ou 15 000 cellules par puits pour la lignée NIH :OVAR-3, dans un volume de 200  $\mu$ L de milieu complet. Après 24 heures, une fois les cellules adhérentes au plastique, le milieu a été retiré puis remplacé par du milieu frais contenant la drogue en diverses concentrations. Dans une même plaque 96 puits, chaque concentration a été faite en triplicata. Les différentes drogues utilisées sont le cisplatine, la cyclophosphamide, la doxorubicine, l'étoposide, la vinorelbine et le taxol. Ces drogues ont été obtenues à la pharmacie du département de chimiothérapie du Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke (CHUS, Sherbrooke, Canada). Après 96 heures

d'exposition à la drogue, le test XTT a été effectué. Pour ce faire, 10 mg de poudre XTT (Molecular Probes, Eugene, Oregon) ont été dissous dans 10 ml de PBS 1X stérile et chauffés à 60°C pendant 30 minutes. Par la suite, à cette solution de XTT a été ajouté 10 ml de milieu de culture DMEM/F12 sans rouge de phénol et 15 µl de PMS (Sigma, Saint-Louis, Missouri). Le milieu de culture conditionné des cellules de la plaque 96 puits a alors été enlevé et remplacé par 100 µl par puits de solution XTT. La plaque a été incubée à la température de la pièce et à la noirceur pendant 30 minutes et l'absorbance a ensuite été lue à une longueur d'ondes de 450 nm avec un lecteur de microplaque Sunrise Tecan (Phenix Research Products, Candler, NC). Les résultats bruts ont par la suite été convertis en pourcentage de survie et mis en graphique en fonction de la concentration de drogue sur une échelle logarithmique.

## 9. Cytométrie de flux

Les cellulesensemencées dans des T-75 ont préalablement été traitées avec 0.1 µg/ml de cisplatine pendant 24 heures, à l'exception des contrôles. Elles ont ensuite été récoltées en les décollant à l'EDTA après un lavage au PBS 1X stérile. Les cellules ont par la suite été centrifugées à 1000 rpm à 4°C pendant 5 minutes. Les culots de cellules ont été lavés au PBS 1X et les cellules ont été mises dans des tubes eppendorfs de 1.5ml (Eppendorf, Mississauga, Canada). Le PBS 1X a ensuite été retiré après une centrifugation de 2 minutes à 3000 rpm à température pièce dans une microcentrifugeuse Biofuge Pico (Heraeus

Instruments, Allemagne). Les cellules ont été fixées à température pièce avec une solution de 2% paraformaldéhyde (Sigma, Saint-Louis, Missouri) pendant 20 minutes. Le paraformaldéhyde a été préparé la journée même de son utilisation en dissolvant la poudre de paraformaldéhyde dans du PBS 1X et en faisant chauffer la solution à 60°C. Lorsque le paraformaldéhyde a été complètement dissout, la solution a été filtrée sur papier Whatmann (No 1004 150, Whatmann, Angleterre). À la fin de la période de fixation des cellules, les tubes ont été centrifugés 2 minutes à 3000 rpm à température pièce et le paraformaldéhyde a été enlevé. Les cellules ont par la suite été incubées 45 minutes à température pièce avec 500 µl de l'anticorps primaire dilué dans une solution de BSA 2% (Fraction V; Roche diagnostics, Indianapolis, IN) faite avec du PBS 1X (voir tableau 3 de la page 72 pour les dilutions des anticorps). Un contrôle avec IgG normales de souris (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a été effectué pour chaque échantillon. Après l'incubation avec l'anticorps primaire, les cellules ont encore une fois été centrifugées 2 minutes à 3000 rpm à température pièce puis lavées avec du PBS 1X avec les mêmes conditions de centrifugation. Les cellules ont ensuite été incubées 45 minutes à la noirceur avec 500 µl de l'anticorps secondaire dilué dans une solution de 2% BSA/PBS 1X (voir tableau 4 de la page 73 pour les dilutions des anticorps). Finalement, les cellules ont été centrifugées 2 minutes à 3000 rpm à température pièce, lavées au PBS 1X, puis recentrifugées. Les cellules ont été resuspendues avec un volume de 400 µl de PBS 1X. Les analyses de cytométrie de flux ont été effectuées avec un appareil FACS SCAN cytometer (Beckman Dickinson, San Jose, CA).

## 10. Immunofluorescence indirecte sur lame.

Les cellules ont étéensemencées sur des lames de verres (Surgipath, Winnipeg, Canada) et laissées dans l'incubateur pendant une période de 24 à 72 heures. Lorsque les cellules ont atteint une confluence d'environ 80%, elles ont été fixées au paraformaldéhyde 3.7% pendant 20 minutes à la suite du lavage des lames avec du PBS 1X pH 6.8. La solution de paraformaldéhyde a été préparée la journée même avec du PBS 1X et la solution a été chauffée à 60°C jusqu'à ce que la poudre soit dissoute, puis filtrée sur papier Whatmann. Après la fixation, les lames ont été lavées 5 minutes avec du PBS 1X froid. Ensuite, les cellules sur les lames ont été perméabilisées avec une solution de PBS 1X/0.1% triton X-100 (ICN Biomedicals, Irvine, CA) pendant 5 minutes. Un lavage de 5 minutes au PBS 1X a par la suite été effectué. Le blocage a été fait en incubant les lames dans une solution de 2% BSA/PBS 1X pendant 45 minutes. Après le blocage, les lames ont été incubées une heure avec une solution contenant l'anticorps primaire dilué dans une solution de BSA 2%/PBS 1X (voir tableau 3 de la page 72 pour les dilutions des anticorps). Pour minimiser la quantité d'anticorps utilisée, le pourtour de l'espace sélectionné pour l'immunofluorescence a été séché à l'aide d'un mouchoir et quelques gouttes de l'anticorps dilué ont été apposées sur cette zone. Les lames ont été incubées dans un récipient fermé contenant de l'eau afin que celles-ci ne sèchent pas. Ensuite, les lames ont subi trois lavages de 10 minutes avec du PBS 1X puis ont été incubées avec l'anticorps secondaire dilué (voir tableau 4 de la page 73 pour les dilutions des anticorps). À cette étape, les lames ont aussi été séchées autour de la zone d'intérêt et quelques gouttes de l'anticorps dilué dans une solution de BSA 2%/PBS

1X ont été apposées sur cette espace. L'incubation a été effectuée à la noirceur et dans une boîte humidifiée. Après deux autres lavages de 10 minutes avec du PBS 1X, la coloration de l'ADN des noyaux a été effectuée par le DAPI. Le DAPI (Roche diagnostics, Indianapolis, IN) a préalablement été dilué 1 : 100 000 dans la solution de blocage puis les lames ont été incubées dans cette solution pendant 2 minutes. Les lames ont par la suite été lavées deux fois pendant 10 minutes avec du PBS 1X. Pour le montage des lames, la zone de l'immunofluorescence a été recouverte de quelques gouttes de milieu de montage (milieu de montage fait selon *Methods of cellular biology*, V31, Chap 19, 1989). Immédiatement après l'ajout du milieu de montage, une lamelle (VWR, Montréal, Canada) a été déposée sur le milieu de montage et a été scellée sur la lame avec du vernis à ongle transparent. Les lames ont ensuite été analysées avec l'objectif 100X d'un microscope à fluorescence Olympus1X70 (Olympus, Hamburg, Allemagne).

## 11. Lyse cellulaire

Les cellules d'un puits de plaque 6 puits (BD Falcon, Bedford, MA) ou d'un T-75 ont été lavées avec 2 ml ou 5 ml de PBS 1X respectivement. Ensuite, les cellules ont été incubées avec agitation pendant 20 minutes à 4°C avec 125 µl (plaque 6 puits) ou 750 µl (T-75) de tampon de lyse (0.01M Tris HCl pH 7.3 (Roche diagnostics, Indianapolis, IN), 0.15M NaCl (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ), 0.01M MgCl<sub>2</sub> (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ), 0.5% NP-40 (EM Science, Darmstadt, Allemagne)). Pour les expériences d'immunoprécipitation

avec l'anticorps contre l'étiquette c-myc, le tampon de lyse (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA (Sigma, St-Louis, Missouri), 1 mM EGTA (Sigma, St-Louis, Missouri), 1% Triton X-100) a été fait selon les conditions de la compagnie Cell Signalling, d'où provient l'anticorps. Aux tampons de lyse fut préalablement ajouté des inhibiteurs de protéases (1 µg/ml d'AEBSF (Sigma, St-Louis, Missouri), 1 µg/ml de leupeptine (Sigma, St-Louis, Missouri), 20 µg/ml d'aprotinine (Sigma, St-Louis, Missouri), 0,7 µg/ml de pepstatine A (Sigma, St-Louis, Missouri)) et, dans le cas de l'analyse de protéines phosphorylées, des inhibiteurs de phosphatases ont aussi été ajoutés (10mM NaF (Sigma, St-Louis, Missouri), 400 µM orthovanadate (Sigma, St-Louis, Missouri), 100 µM  $\text{Na}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$  (Sigma, St-Louis, Missouri)). Après l'incubation pour effectuer la lyse cellulaire, le lysat a été récupéré à l'aide d'un grattoir (Starstedt, Newton, NC) et centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été conservé à -20°C pour analyse future ou a été utilisé immédiatement dans le cas de l'analyse de protéines phosphorylées. Pour certaines analyses, les cellules en suspension et les cellules adhérentes ont été récoltées. Pour ce faire, le milieu contenant les cellules en suspension et les cellules adhérentes ont été récoltés à l'aide d'un grattoir, puis le tout a été centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le culot a été lysé pendant 10 minutes sur glace avec la même quantité de tampon de lyse que précédemment. Comme dans le cas antérieur, le lysat a ensuite été centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C et le surnageant a été conservé pour effectuer les analyses.

### 11.1 Dosage protéique

Afin de faire une courbe standard, des solutions de BSA de concentrations de 0 mg/ml, 0.088 mg/ml, 0.176 mg/ml, 0.353 mg/ml, 0.705 mg/ml et 1.41 mg/ml ont été préparées et les lysats ont été dilués 1 :10 avec de l'eau. Le réactif de Bradford (Biorad, Hercules, CA) a ensuite été dilué 1 :5 avec de l'eau distillée et un volume de 1 ml de cette solution a été déposé dans chaque cuvette de plastique (Starstedt, Newton, CA) pour spectrophotomètre. Par la suite, 20  $\mu$ l de solution de courbe standard ou de l'échantillon dilué ont été déposés dans les cuvettes. Après avoir laissé la réaction de coloration s'effectuer à température pièce pour une durée allant de 5 à 60 minutes, la densité optique de chaque cuvette a été prise à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Une courbe standard a été réalisée en portant la concentration protéique en fonction de la densité optique et la concentration protéique des échantillons a été déterminée à partir de cette courbe.

### 12. Mesure de l'activité de la caspase-3

La mesure de l'activité de la caspase-3 a été effectuée à l'aide de l'ensemble commercial Caspase-3 Fluorometric Kit de R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN). Cet ensemble commercial consiste en l'utilisation d'un substrat synthétique fluorogénique (DEVD-AFC) de la caspase-3. Ce substrat imite en fait le site de clivage de PARP par la

caspase-3. Lorsque la caspase-3 clive le substrat, un fluorochrome est libéré et cette fluorescence peut être mesurée à l'aide d'un fluorimètre. Pour ce test, les cellules adhérentes et en suspension (provenant de 2 puits de plaque 6 puits pour chaque échantillon) ont été récoltées à l'aide d'un grattoir. Les cellules et le milieu de culture ont été centrifugés à 4°C pendant 5 minutes à 1000 rpm. Ensuite, les cellules ont été lavées avec 3 ml de PBS 1X puis recentrifugées. Le culot de cellules a été resuspendu avec 125 µl de tampon d'extraction froid (R&D Systems, Minneapolis, MN) puis incubées 10 minutes sur glace. Le lysat a par la suite été centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 5000 rpm. Une partie de ce lysat a été utilisée afin de faire un dosage protéique avec le réactif de Bradford. Parallèlement, 50 µl de tampon de réaction 2X (R&D Systems, Minneapolis, MN), 5 µl de substrat DEVD-AFC (R&D Systems, Minneapolis, MN) et 10 µl de DTT (R&D Systems, Minneapolis, MN) ont été ajoutés dans chaque cuvette pour fluorimètre. Ensuite, 50 µl de lysat ont été ajoutés à chaque cuvette et la réaction a été incubée à la noirceur pendant une heure à 37°C. Après l'incubation, les unités de fluorescence relative de chaque échantillon ont été mesurées à l'aide d'un fluorimètre Versafluor™ (Biorad, Hercules, CA). Le fluorochrome a été excité à l'aide d'une longueur d'ondes de 400 nm et la longueur d'ondes d'émission a été mesurée à 505 nm. Les résultats de fluorescence ont ensuite été divisés par le nombre de microgrammes de protéines contenus dans l'échantillon, afin d'obtenir une mesure en RFU/µg de protéines.



### 13. Immunoprécipitation

Les cellules ont été lysées et les protéines des lysats résultants ont été dosées à l'aide de la méthode de Bradford. Pour les immunoprécipitations de CA125, afin de stimuler la phosphorylation de sa queue cytoplasmique, les cellules NIH-OVCAR-3 ont été traitées pendant 5 minutes avec 100 ng/ml de EGF humain recombinant (R&D Systems, Minneapolis, MN) avant d'être lysées. Une quantité de 300 µg ou 1,5 mg de protéines a été utilisé et le volume a été ajusté avec le tampon de lyse afin d'obtenir une concentration de protéines de 1 mg/ml. Ensuite, 1 µg d'anticorps (ou 3 µg lors de l'utilisation de 1.5mg de protéines) dirigé contre la protéine à immunoprécipiter a été ajouté, suivi d'une incubation sous agitation à 4°C toute la nuit. La provenance des anticorps est indiquée au tableau 3 de la page 72. L'anticorps VK-8 a pour sa part été purifié dans le laboratoire à partir de l'hybridome VK-8 (BEAUDIN, 2003). Les billes G-agarose (Upstate, Lake Placid, NY) ont préalablement été lavées trois fois avec 500 µl de tampon d'immunoprécipitation [pour anticorps anti-c-myc : 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100; pour les autres anticorps : 0.1% SDS (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ), 0.1M NaCl, 0.001M EDTA, 0.02M Tris-HCl pH 8.0, 0.5% NP-40, 0.5% sodium déoxycholate (Sigma, St-Louis, Missouri)] suivi d'une centrifugation de 10 secondes à 13 000 rpm. Les billes ont par la suite été resuspendues avec le tampon d'immunoprécipitation dans un volume égal à celui du culot des billes lavées. Les billes G-agarose ont été ajoutées aux immunoprécipitations à raison de 20 µl de billes par échantillon, suivi d'une incubation sous agitation à 4°C pendant 2 heures. Ensuite, les billes et les protéines complexées à celles-ci

ont été lavées cinq fois avec 500 µl de tampon d'immunoprécipitation. Le culot de billes a par la suite été resuspendu dans 20 à 50 µl de tampon de chargement pour SDS-PAGE 4X (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 40% glycérol (EM Sciences, Darmstadt, Allemagne), 576 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma, St-Louis, Missouri), rouge de phénol (jusqu'à obtention d'une coloration rouge) (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ)) et les échantillons ont été chauffés 5 minutes à 95°C. Après centrifugation pour retirer les billes, les échantillons ont été mis sur gel SDS-PAGE ou analysés par spectrométrie de masse.

14. Gel SDS-PAGE, immunobuvardage de type western, coloration au Sypro Ruby et coloration au nitrate d'argent

Premièrement, un gel d'acrylamide (EMD, Darmstadt, Allemagne) a été fait, selon l'expérience, à une concentration de 7.5%, 10%, 12% ou 15% dans le cas du gel séparateur et de 4% pour le gel concentrateur. Le tampon de chargement pour SDS-PAGE 4X a ensuite été ajouté aux échantillons et ceux-ci ont été déposés sur gel. Le gel a été migré environ 1 heure à 150 V. Pour l'immunobuvardage, le transfert des protéines sur une membrane de PVDF (Roche diagnostics, Indianapolis, IN) a été effectué à 4°C pendant 90 minutes sous un courant de 300 mA dans un tampon de transfert froid contenant 20% méthanol (EMD, Darmstadt, Allemagne), 25 mM Tris et 192 mM glycine (Roche diagnostics, Indianapolis, IN). Ensuite, le blocage a été effectué à température pièce pendant une heure dans une solution de 4% de lait (Biorad, Hercules, CA) faite avec du PBS

1X/0.01% Tween 20 (EMD, Darmstadt, Allemagne). La membrane a ensuite été incubée à 4°C toute la nuit avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage ou dans une solution 2% BSA dans du PBS 1X/0.01% Tween 20 (voir tableau 3 de la page 72 pour les conditions d'utilisations de chaque anticorps). Le lendemain, la membrane a été lavée trois fois avec du PBS 1X/ 0.01% Tween 20 pendant 15 minutes. La membrane a ensuite été incubée à température pièce pendant 45 minutes avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de blocage. Lorsque l'anticorps primaire provenait de la compagnie Cell Signalling Technology, l'anticorps secondaire de la même compagnie a été utilisé. Dans les autres cas, l'anticorps secondaire utilisé a été celui de la compagnie Amersham (voir tableau 4 de la page 73 pour les conditions de chaque anticorps). La membrane a ensuite été lavée trois fois 15 minutes avec du PBS 1X/ 0.01% Tween 20 puis la révélation a été effectuée avec le réactif ECL PLUS (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Angleterre), selon le protocole du fabricant.

La coloration des protéines d'un gel SDS-PAGE au nitrate d'argent a tout d'abord débutée en fixant les protéines dans le gel en incubant celui-ci pendant 30 minutes dans une solution contenant 50% méthanol et 10% acide acétique (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ). Par la suite, le gel a été incubé 15 minutes dans une solution 5% méthanol, puis lavé trois fois 5 minutes avec de l'eau distillée. Ensuite, le gel a été mis pendant 2 minutes dans une solution contenant 1.26 mM de thiosulfate de sodium fraîchement préparée (Sigma, St-Louis, Missouri) et a été lavé 5 minutes à trois répétitions avec de l'eau distillée. Le gel a par la suite été incubé 25 minutes dans une solution contenant 11.77 mM de nitrate d'argent (Laboratoire Mat, Montreal, Canada) et la couleur a été ensuite développée en mettant le gel

dans une solution de 283 mM de carbonate de sodium (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ), 0.02% HCOH (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ) et 25.2  $\mu$ M de thiosulfate de sodium. Lorsque les bandes ont été colorées de manière satisfaisante, la réaction a été arrêtée à l'aide d'une solution de Na<sub>2</sub>-EDTA 37.6 mM.

La coloration d'un gel SDS-PAGE avec le Sypro Ruby (Molecular Probes, Eugene, Oregon) a été effectuée selon les directives du fabricant. Les protéines dans le gel ont été visualisées et photographiées sous une lumière ultraviolette à l'aide d'un appareil Bio/Can True View 300 (BioCan Scientific Inc).

#### 14.1 Identification par spectrométrie de masse de protéines migrées sur gel

Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées par le laboratoire de spectrométrie de masse de Dr Guy Poirier situé au Centre de Recherche Clinique du CHUL, à Québec. Brièvement, la technique utilisée a consisté en la migration d'un échantillon protéique sur gel SDS-PAGE contenant un gradient de concentration d'acrylamide de 4% à 12%. Puis, la piste contenant l'échantillon a été découpée en plusieurs sections d'un millimètre qui ont été déposées dans les puits d'une plaque 96 puits. Ensuite, les protéines contenues dans ces sections de gel ont été digérées avec la protéase trypsine. Les peptides résultants de cette digestion ont été analysés par spectrométrie de masse LC MS/MS à l'aide d'un appareil Q-TOF et identifiés avec le module Peptide/ProteinProphet.

## 15. Extraction d'ARN

Toutes les étapes de l'extraction de l'ARN ont été faites de manière à minimiser la présence de RNase. Le milieu de culture des cellules cultivées en plaque 6 puits a été enlevé et les cellules ont été lavées avec 2 ml de PBS1X stérile par puits. Dans chaque puits, 2 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) ont été ajoutés sur les cellules et ces dernières ont été récoltées à l'aide d'un grattoir stérile. Les tubes ont ensuite été agités sur un appareil vortex (VWR, Montreal, Canada) puis incubés 5 minutes à température de la pièce. Par la suite, 200 µl de chloroforme (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ) ont été ajoutés à chaque tube et ceux-ci ont été agités 20 secondes puis incubés à température de la pièce pendant 10 minutes. Les échantillons ont été centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 13 000 rpm et la phase aqueuse a été transférée dans un autre tube. À cette phase ont été ajoutés 500 µl de chloroforme et les tubes ont été agités et centrifugés brièvement. Encore une fois, la phase aqueuse a été prélevée et un volume d'isopropanol 100% (VWR, Montreal, Canada) égal à cette phase y a été ajouté. Les tubes ont été agités 20 secondes et incubés 5 minutes à la température de la pièce puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minute à 4°C. Le surnageant a été enlevé et le culot a été lavé avec 900 µl d'éthanol 75% (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ). Après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C, le culot d'ARN a été séché et resuspendu avec 25 µl d'eau stérilisée deux fois et sans RNase. Finalement, les échantillons ont été chauffés 10 minutes à 65°C et conservés à -80°C.

### 15.1 Synthèse de l'ADNc

Dans un volume final de 15  $\mu$ l, 2  $\mu$ g d'ARN ont été ajouté à 1  $\mu$ g d'amorces oligo dT (5'TTTTTTTTTTTTTTTT3') (synthétisé par Invitrogen, Carlsbad, CA) et le tout a été incubé 5 minutes à 70°C puis mis sur glace pendant 5 minutes. Ensuite, 4.5  $\mu$ l d'eau sans RNase, 5  $\mu$ l de tampon 5X pour AMV-RT (Promega, Madison, WI), 2  $\mu$ l d'une solution de 25  $\mu$ M dNTPs (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada) et 90 U de l'enzyme AMV-RT (Promega, Madison, WI) ont été ajoutés, dans cet ordre. La réaction de synthèse d'ADNc a ensuite été incubée à 42°C pendant une heure puis conservée à -20°C.

## 16. Amplification des inserts et clonage

### 16.1 Description des plasmides

Le plasmide pME18S-FL3 (Helix Research Institute, Japon) (Genbank #AB009864) est un vecteur d'expression eucaryote ayant été utilisé lors de la création d'une librairie d'ADNc humain par la méthode de l'oligo-capping dans le cadre de projet NEDO de séquençage d'ADNc humain (voir figure 6). Les différents ADNc ont été clonés dans ce vecteur à l'intérieur du site de restriction de l'enzyme DraIII et en aval d'une région comprenant le

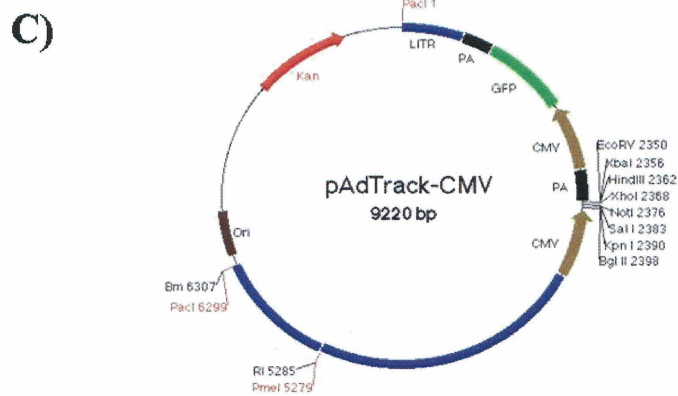
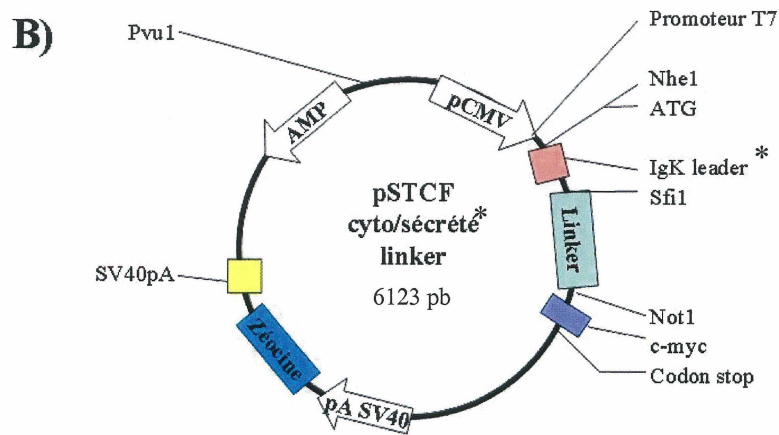
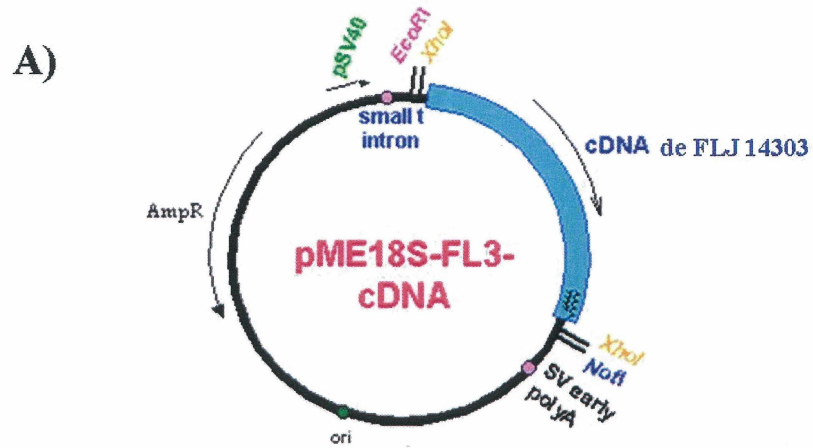
promoteur SR $\alpha$  et l'intron petit-t (Helix Research Institute, Japon). Parmi les clones de la librairie obtenue, un d'entre eux contient l'ADNc de FLJ14303, qui correspond aux domaines cytoplasmique, transmembranaire et unique ainsi que trois répétitions de CA125 (Genbank # AK024365).

Les plasmides pSTCF sécrété linker et pSTCF cyto linker (voir figure 6) sont dérivés du plasmide pSecTag (Invitrogen, San Diego, CA, États-Unis). Ce sont des vecteurs d'expression eucaryote ayant un promoteur fort CMV en amont du site de clonage comprenant entre autres les sites de restriction des enzymes SfiI et NotI. Lors du clonage d'une séquence d'ADN dans ces vecteurs, l'insert remplace le linker compris entre les sites de restriction SfiI et NotI. Seulement dans le cas du plasmide pSTCF sécrété linker, on retrouve une séquence IgK leader immédiatement après le codon ATG. Cette séquence IgK leader est un signal permettant à la protéine produite de passer par la voie de sécrétion. Le plasmide pSTCF cyto linker n'a pas cette séquence et permet donc, contrairement à son homologue sécrété, de produire une protéine cytoplasmique sans que celle-ci ne passe par cette voie de sécrétion. Les plasmides pSTCF sécrété linker et pSTCF cyto linker contiennent aussi un site de restriction unique de l'enzyme PvuI. Le gène de résistance à la Zéocine permet de sélectionner les cellules ayant incorporé les plasmides pSTCF sécrété linker et pSTCF cyto linker tandis que le gène de résistance à l'ampicilline permet de faire une pression de sélection lors de l'amplification des plasmides dans un système bactérien. Finalement, juste avant le codon stop se trouve une séquence c-myc permettant à la séquence clonée dans ce vecteur d'être produite en fusion avec une étiquette c-myc. L'ajout

**Figure 6 : Cartes des plasmides.**

(A) pME18S-FL3 (<http://kugi.kribb.re.kr/KUGI/doc/pME18S-FL3/>), (B) pSTCF cyto linker et pSTCF sécrété linker et (C) pAdTrack CMV ([www.coloncancer.org/adeasy/pAdTrack-CMV.jpg](http://www.coloncancer.org/adeasy/pAdTrack-CMV.jpg)).





d'une séquence c-myc aux inserts a été effectué à l'aide des amorces de PCR (voir section portant sur l'amplification de l'ADN par PCR).

Le vecteur pAdTrack CMV contient l'ADNc de la protéine GFP sous le contrôle du promoteur fort CMV (voir figure 6). La transfection de ce plasmide dans une cellule eucaryote permet la production de la protéine GFP et la visualisation de cette cellule à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus1X70. Ce vecteur a été utilisé lors de transfection de cellules eucaryotes afin de connaître l'efficacité de la transfection.

## 16.2 Amplification d'ADN par PCR

Lors de l'amplification d'une séquence d'ADN par PCR, 10 ng d'ADN contenant la séquence à amplifier ont été utilisés. Le vecteur PME18S-FL3 contenant le FLJ14 303 a été utilisé pour l'amplification des inserts pour le clonage. Ensuite, 1 µl de chacune des deux amorces, préalablement resuspendues à une concentration finale de 50 nmoles/ml, a été ajouté, de même que 5 µl de tampon de réaction 10X de l'enzyme Pfu Ultra (Stratagene, La Jolla, CA) et 0.4 µl d'une solution de 25 mM de dNTPs. Les amorces de PCR permettent l'ajout d'un site de restriction SfiI en 5' et d'un site de restriction NotI en 3' et sont détaillées au tableau 2 de la page 64. De plus, l'amorce en 3' de la séquence à amplifier comprend les séquences pour l'ajout d'une étiquette polyhistidine en C-terminal de la protéine produite. Les vecteurs pSTCF sécrété linker et pSTCF cyto linker permettent

l'ajout d'une étiquette c-myc. Le volume de la réaction de PCR a ensuite été ajusté à 50 µl avec de l'eau distillée et de l'huile minérale (Sigma, St-Louis, Missouri) a été déposée sur le dessus de ce mélange afin d'éviter l'évaporation. Les échantillons ont été mis dans l'appareil pour PCR (Eppendorf Mastercycler, Brinkmann, Mississauga, Canada) et la réaction a débuté par le chauffage des échantillons à 94°C pendant 5 minutes, puis 2,5 U de l'enzyme Pfu Ultra (Stratagene, La Jolla, CA) ont été ajoutés. Par la suite, la réaction d'amplification a été faite comme suit : 1 minute à 94°C, 1 minute à la température d'appariement (voir tableau 2) et deux minutes à 72°C. Ces étapes ont été répétées 29 fois, pour un total de 30 cycles.

**Tableau 2 : Conditions de PCR.**

Amorces, températures d'appariement et taille des produits de PCR du clonage des constructions MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD. L'amorce 5' est décrite la première. TM : transmembranaire. Cyto : cytoplasmique.

Domaines de CA125 amplifiés	Amorces (synthétisées par IDT Inc, Coralville, IA)	Températures d'appariement	Tailles du produit de PCR
TMcyto	5' ATGCGGCCCAGCCGGCCTTCTGGGC TGTCATCTTCAT3' 5' ATAGTTTAGCGGCCGCGCATGATGATG ATGATGATGACCACCGCTTTGCAGAT CCTCCAGGTCT3'	53°C	168 pb
Unique	5' ATGCGGCCCAGCCGGCCATCACCCCT GCTGAGGGGAC3' 5' ATAGTTTAGCGGCCGCGCATGATGATG ATGATGATGACCACCGCTGAAGGGAA GGTCAGAATTCC3'	57°C	687 pb
UniqueTMcyto (MUC16-CTD)	5' ATGCGGCCCAGCCGGCCATCACCCCT GCTGAGGGGAC3' 5' ATAGTTTAGCGGCCGCGCATGATGATG ATGATGATGACCACCGCTTTGCAGAT CCTCCAGGTCT3'	59°C	855 pb

Ensuite, la réaction a été incubée 15 minutes à 72°C puis mis à 4°C jusqu'à son analyse sur gel d'agarose. Cette analyse s'est effectuée en migrant les échantillons pendant 20 minutes à 120 V sur un gel d'agarose LE (Roche diagnostics, Indianapolis, IN) d'une concentration entre 0.8% et 2% selon la taille du produit de PCR (voir tableau 2 pour la taille des produits). La migration a été faite en parallèle avec un standard de poids moléculaire DNA 1kb ladder (Promega, Madison, WI). Le bromure d'éthidium (Pharmacia, Biotech, Suède), préalablement ajouté au gel selon une dilution 1 :10 000, a permis de visualiser l'ADN sous lumière ultraviolette à l'aide d'un appareil Bio/Can True View 300.

### 16.3 Clonage

Après avoir effectué l'amplification de la séquence de l'insert, la totalité du produit de PCR a été migré sur gel d'agarose d'une concentration variant entre 0.8% et 2% selon l'expérience. En comparant avec le standard de poids moléculaire, la bande correspondant à la taille de l'insert a été découpée suite à sa visualisation à l'aide d'une lumière ultraviolette. L'ADN a par la suite été extrait du gel à l'aide du QIAquick Gel extraction Kit de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Canada) selon les directives expérimentales du fabricant. Par la suite, l'ADN a été digéré avec l'enzyme SfiI toute la nuit à 50°C. La totalité de l'ADN a été utilisée pour la digestion ainsi que 5 µl de tampon 10X NEB 2 (New England Biolabs, Pickering, Ontario), 100 µg/ml de BSA (New England Biolabs, Pickering, Ontario) et 10 U de l'enzyme SfiI (New England Biolabs, Pickering, Ontario). Le volume a été ajusté à 50 µl

avec de l'eau stérile et 50 µl d'huile minérale ont été déposés sur le dessus afin d'éviter l'évaporation lors de l'incubation. Le lendemain, le même ADN a été digéré avec l'enzyme NotI. Pour ce faire, le tampon de réaction de la précédente digestion a dû être complété avec 2 µl de tampon 10X NEB 3, 2 µl de BSA 1 mg/ml, 2.5 µl de NaCl 1M et 2 µl de Tris-HCl 1M pH 7.5. Ensuite, 10 U de l'enzyme NotI (New England Biolabs, Pickering, Ontario) ont été ajoutés, le volume a été ajusté à 75 µl avec de l'eau et la digestion a été incubée toute la journée à 37°C. Parallèlement, les vecteurs pSTCF sécrété linker et pSTCF cyto linker (voir figure 6) ont été digérés dans les mêmes conditions. Toutefois, les temps d'incubation ont été de 90 minutes et de 1 heure pour les enzymes SfiI et NotI respectivement. Ensuite, les protéines et portions d'ADN résultants de la digestion ont été enlevés de la solution contenant les inserts à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Canada) selon les directives du fabricant. Les vecteurs digérés ont été migrés sur gel d'agarose et purifiés avec le QIAquick Gel extraction Kit de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Canada) selon les directives expérimentales du fabricant. Cette étape permet de retirer la séquence linker qui est libérée des vecteurs lors de la digestion SfiI/NotI car cette séquence pourrait compétitionner avec l'insert lors de la ligation. Par la suite, la réaction de ligation des vecteurs avec les inserts a été effectuée. Pour ce faire, la concentration de chacun des ADN digérés a été évaluée approximativement en migrant côte à côte ces ADNs sur gel d'agarose. Ensuite, les ADNs des vecteurs et des inserts ont été incubés ensemble dans un ratio insert : vecteur de 3 :1 avec 1 µl de tampon 10X de l'enzyme T4 DNA ligase (New England Biolabs, Pickering, Ontario) et 200 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs, Pickering, Ontario). Le volume a ensuite été ajusté à 10 µl avec de l'eau distillé et la réaction de ligation a été incubée toute la nuit à 16°C. Les

constructions pSTCF sécrété Unique<sup>TM</sup>cyto, pSTCF sécrété Unique et pSTCF cyto <sup>TM</sup>Mcyto seront appelées MUC16-CTD, MUC16-Unique et MUC16-<sup>TM</sup>Mcyto respectivement, afin de simplifier la nomenclature.

#### 16.4 Transformation bactérienne par choc thermique

Pour la transformation bactérienne, les bactéries compétentes ont été produites selon la méthode du livre de référence Molecular cloning, A laboratory Manual (SAMBROOK et RUSSELL, Vol.1 p1.116-1.118, Protocole 25). Le volume total de la ligation a été ajouté à 100 µl de bactéries XL1 compétentes puis une incubation de 10 minutes sur glace a été effectuée. Ensuite, le choc thermique a été fait en incubant les tubes pendant 90 secondes à 42°C. Les tubes contenant les bactéries ont par la suite été déposés sur glace pendant deux minutes puis 900 µl de milieu LB [Yeast Extract, EM Sciences, Darmstadt, Allemagne; BactoTryptone, Fisher scientific, Fair Lawn, NJ; NaCl (SAMBROOK ET RUSSELL, 2001)] sans antibiotique ont été ajoutés. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant une heure avec agitation constante. Par la suite, les bactéries ont été étalées sur des pétris 10 cm (Fisherbrand, Ottawa, Canada) recouvert de LB/agar (EMD, Darmstadt, Allemagne) contenant l'antibiotique ampicilline (USB corporation, Cleveland, Ohio) à une concentration de 100 µg/ml et ont été incubés à l'envers à 37°C dans un incubateur Gravity convection incubator (GCA corporation, Chicago, IL).

La recherche de clones positifs a été effectuée en piquant plusieurs colonies obtenues lors de la transformation et en les amplifiant dans un volume de 5 ml de LB liquide avec 100 µg/ml d'ampicilline. Une extraction de l'ADN plasmidique a ensuite été effectuée à partir de ces bactéries selon le protocole du livre de référence *Molecular cloning, A laboratory Manual* (SAMBROOK et RUSSELL, Vol.1 p1.32-1.34, Protocole 1). L'ADN plasmidique a ensuite été migré sur gel d'agarose 0.8% afin de sélectionner les clones ayant un ADN plasmidique de la bonne taille. À partir de l'ADN plasmidique des clones sélectionnés, une réaction d'amplification par PCR ou une digestion avec les enzymes SfiI et NotI a ensuite été faite afin de vérifier sur gel d'agarose la présence et la taille de l'insert dans le plasmide. Par la suite, la purification d'une grande quantité du plasmide validé a été faite par l'utilisation du système de MaxiPrep de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Canada), selon le protocole fourni par le fabricant.

#### 17.1 Transfection cellulaire transitoire

Pour la transfection cellulaire transitoire, 3 µl de Fugene 6 (Roche diagnostics, Indianapolis, IN) et 2 µg d'ADN ont été ajoutés à 100 µl de milieu DMEM sans sérum. Ce mélange a été incubé à température pièce pendant 1 heure. La solution de transfection a ensuite été ajoutée à 500 000 cellules COS-7 en suspension ayant étéensemencées dans une plaque 6 puits dans un volume de 1 ml de milieu sans sérum. Le lendemain, 1 ml de milieu complet par puits a été ajouté et les cellules ont été utilisées 72 heures après la transfection. L'efficacité de

transfection a été vérifiée en transfectant en parallèle des cellules de la même lignée avec le vecteur pAdTrack CMV et en regardant l'expression de la GFP à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus 1X70.

## 17.2 Transfection cellulaire stable

Les constructions d'ADN pSTCF sécrété linker (vecteur vide) et MUC16-CTD ont été linéarisées avec l'enzyme de restriction PvuI. Pour ce faire, 2 µg d'ADN ont été utilisés et 5 µl de tampon 10X NEB 3 (New England Biolabs, Pickering, Ontario), 100 µg/ml BSA et 5 U PvuI (New England Biolabs, Pickering, Ontario) ont été ajoutés à la solution contenant l'ADN. Le volume a été ajusté à 50 µl avec de l'eau distillée et la réaction de digestion a été incubée à 37°C pendant 2 heures et demie. Afin d'enlever toutes les impuretés reliées à la digestion, l'ADN linéarisé a été précipité en y ajoutant dans l'ordre 1µl de glycogène (Roche diagnostics, Indianapolis, IN) 20 mg/ml, 5 µl de 7.5M NH<sub>4</sub>OAc (BDH, Toronto, Canada) et 125 µl d'éthanol 95% froid. Après avoir bien agité, la précipitation a été effectuée à -80°C pour une période de 2 heures. Ensuite, les tubes ont été centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 13 000 rpm puis le surnageant a été jeté. Le culot d'ADN a ensuite été lavé avec 750 µl d'éthanol 70% froid et les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été enlevé par inversion et le culot a été resuspendu dans 10 µl d'eau distillée stérile. Ensuite, pour la transfection, 100 µl de DMEM/F12 sans sérum avec 6 µl de Fugene et 2 µg d'ADN pendant 1 heure à température de la pièce. Les cellules



SKOV-3 ont préalablement étéensemencées 24 heures à l'avance dans des pétris de 6 cm (BD Falcon, Bedford, MA), à raison de 225 000 cellules dans un volume de 4 ml de milieu DMEM/F12 complet. Le milieu des cellules ensemencées la veille a été retiré et remplacé par 2 ml de milieu frais sans sérum puis la solution de transfection a été ajoutée aux cellules. Quatre pétris ont été transfectés : un avec le vecteur vide linéarisé, un avec MUC16-CTD linéarisé, un avec pAdTrack CMV (pour connaître l'efficacité de transfection) et le dernier avec l'agent de transfection mais sans ADN. Le lendemain, 2 ml de milieu complet par pétri ont été ajoutés. Lorsque les cellules ont atteint la confluence, les cellules d'un pétri de 6 cm ont été décollées et ensemencées dans deux pétris de 10 cm sans être centrifugées. La drogue de sélection Zéocine (Invitrogen, Carlsbad, CA) a alors été ajoutée dans une concentration de 500 µg/ml. Le milieu des cellules a été changé aux trois jours et les cellules ont constamment été en présence de la Zéocine pendant toute la durée de sélection. Après 22 jours, lorsque les cellules non-transfectées ont toutes été tuées par la Zéocine, les cellules résistantes à la Zéocine provenant des transfections SKOV-3 vecteur vide et SKOV-3 MUC16-CTD ont été amplifiées. Elles ont par la suite subi un passage routinier 1 :10 une fois par semaine et ce, toujours en présence de 500 µg/ml de Zéocine.

#### 18. Purification de protéines par colonne de nickel

Les cellules COS-7 transfectées transitoirement avec les vecteurs pSTCF cyto linker (vecteur vide) et MUC16-TMcyto ont été lysées avec un tampon contenant 10mM imidazole

(Sigma, St-Louis, Missouri), 0.01M de Tris HCl pH 7.3, 300 mM de NaCl, 0.01M de  $MgCl_2$ , 0.5% de NP-40. Un dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford et un volume équivalent à 6 mg de protéines a été utilisé. Un volume de 200  $\mu$ l de résine Ni-NTA agarose (Qiagen, Mississauga, Canada) a été ajouté à chacun des lysats et le tout a été incubé avec agitation pendant 2 heures à 4°C afin de permettre la liaison de l'étiquette polyhistidine à la résine. Pendant cette incubation, deux colonnes de 5 ml (Biorad, Hercules, CA) ont été équilibrées avec 1 ml de tampon de lyse puis les lysats contenant la résine ont été mis chacun sur une colonne. La solution s'écoulant de la colonne a été recueillie sous forme de fractions de 500  $\mu$ l. Ces fractions ont été nommées "F" pour flow-through. Par la suite, chaque colonne a été lavée quatre fois avec 1 ml de tampon de lavage (50 mM  $NaH_2PO_4$  (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.05% Tween 20, pH 8.0) et des fractions de 500  $\mu$ l ont été recueillies et nommées "L" pour lavage. Pour l'élution, 750  $\mu$ l de tampon d'élution (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 0.05% Tween 20, pH 8.0) ont été déposés sur chaque colonne et des fractions de 250  $\mu$ l ont été recueillies et nommées "E" pour élution. Pour connaître le profil d'élution par rapport aux différentes fractions recueillies, l'absorbance et la concentration protéique de chaque fraction ont été mesurées à l'aide de la méthode de Bradford. Finalement, la présence de la protéine d'intérêt a été vérifiée par immunobuvardage de type western et la pureté de la protéine a été vérifiée en colorant au nitrate d'argent un gel SDS-PAGE sur lequel avait été migré les différentes fractions de la purification sur colonne de nickel.

**Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés et conditions d'utilisation.**

Anticorps	Compagnie	Dilution pour immuno-buvardage de type western	Dilution pour cytométrie de flux	Dilution pour immuno-fluorescence
Anti-CA125 clone M11 (souris)	DAKO, Carpinteria, CA	1 :750	1 :500	
Anti-Bax clone N-20 (lapin)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	1 :400		
Anti-XIAP (lapin)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA	1 :1000		
Anti-pro-caspase-3 (lapin)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA	1 :1000		
Anti-pro-caspase-9 (lapin)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA	1 :1000		
Anti-Bcl-2 clone 124 (lapin)	DAKO, Carpinteria, CA	1 :1000*		
Anti-Bcl-X <sub>L</sub> (lapin)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA	1 :1000		
Anti-PARP (lapin)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA	1 :2000		
Anti-c-myc tag clone 9B11 (souris)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA	1 :1000		
Anti-polyhistidine His-probe H-15 (lapin)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	1 :1000		
Anti-αtubuline clone B512 (souris)	Sigma, St-Louis, Missouri	1 :30 000		
Anti-GAPDH (souris)	Fitzgerald Industries Inc, Concord, MA	1 :10 000		
Anti-AKT (lapin)	Cell Signalling Technology	1 :1000*		
Anti-phospho (Ser 473)-AKT (lapin)	Cell Signalling Technology	1 :1000*		
Anti-FOXO3a (lapin)	Upstate, Lake Placid, NY	1 :500		1 :100

\* : dilution dans une solution de BSA 3% dans PBS 1X/ 0.01% Tween 20; si aucune indication : dilution dans la solution de blocage.

**Tableau 4 : Anticorps secondaires utilisés et conditions d'utilisation**

Anticorps	Compagnie	Dilution pour immuno-buvardage de type western	Dilution pour cytométrie de flux	Dilution pour immuno-fluorescence
Anti-souris IgG couplé à HRP	Amersham Biosciences, Angleterre	1 :10 000		
Anti-lapin IgG couplé à HRP	Amersham Biosciences, Angleterre	1 :10 000		
Anti-lapin IgG couplé à HRP	Cell Signalling Technology, Danvers, MA	1 :3000		
Anti-lapin IgG couplé à Oregon Green	Molecular Probes, Eugene, Oregon			1 :1000
Anti-souris IgG couplé à R-PE	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Mississauga, Canada		1 :1000	

## RÉSULTATS

### 19. Sensibilité aux agents cytotoxiques des cellules CA125-knockdown

Des essais de sensibilité à différents agents cytotoxiques ont été faits avec les clones CA125-knockdown dérivés de la lignée de cancer de l'ovaire NIH : OVCAR-3. Ces essais ont été effectués dans le but de savoir si la perte de CA125 à la surface des cellules affecterait la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques. Des drogues ayant différents mécanismes d'action ont été expérimentées. Le cisplatine et le taxol ont été les premières drogues à être testées puisque ces deux drogues sont utilisées en première ligne lors du traitement d'un cancer épithélial de l'ovaire. Le cisplatine est une drogue de type platine affectant l'ADN, tandis que le taxol est un inhibiteur de la dynamique des microtubules. D'autres drogues appartenant à la classe des agents créant des dommages à l'ADN et des inhibiteurs de la dynamique des microtubules, telles que l'étoposide, la cyclophosphamide, la doxorubicine et la vinorelbine, ont aussi été utilisées.

La sensibilité des cellules à ces drogues a été mesurée grâce à un test de viabilité cellulaire à l'aide du XTT (SCUDIERO et al, 1988). Ce test mesure en fait l'activité métabolique des cellules, mais est bien accepté dans la littérature comme étant un test de mesure de la survie ou de la prolifération cellulaire (HOPER, 1997; SCUDIERO et al, 1988). Les cellules utilisées pour ces tests sont les clones CA125-knockdown 1 :9 #9, 1 :9 #7 ainsi que le clone

scFv contrôle et la lignée parentale OVCAR-3. Une fois les tests de viabilité effectués, les résultats de sensibilité ont été convertis sous forme d'histogrammes représentant le pourcentage de survie des cellules traitées avec une concentration de drogue près de l'IC50 des cellules de la lignée parentale. L'IC50 représente la concentration de drogue à laquelle 50% des cellules sont tuées. Pour chacune des drogues utilisées, les essais ont été faits à deux ou trois reprises de manière indépendante.

La figure 7 montre la sensibilité des cellules aux six drogues testées. Tout d'abord, en (A), on voit que les clones CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 sont environ trois à quatre fois plus sensibles au cisplatine que la lignée parentale OVCAR-3 ou le clone scFv contrôle. La même tendance est observée pour les autres drogues causant des dommages à l'ADN, c'est-à-dire la cyclophosphamide, la doxorubicine et l'étoposide. En effet, tel que montré en (B), les cellules CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 sont de deux à trois fois plus sensibles à la cyclophosphamide par rapport aux cellules contrôles. La même propension est constatée pour la doxorubicine en (C), où les clones CA125-knockdown sont de trois à quatre fois plus sensibles à cette drogue en comparaison avec les lignées contrôles. Également, les essais de sensibilité à l'étoposide démontrent que la perte de CA125 à la membrane sensibilise de trois à quatre fois les cellules à cette drogue, tel que montré en (D). Par opposition, aucune différence significative de sensibilité n'est observée pour ce qui est des drogues qui affectent la dynamique des microtubules. En effet, on peut voir en (E) et en (F), que la sensibilité au taxol et à la vinorelbine est la même chez les clones CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 que celle retrouvée chez les cellules contrôles de la lignée parentale ou du clone scFv contrôle.

Il semble donc y avoir une spécificité de sensibilité aux agents génotoxiques chez les cellules CA125-knockdown. Ces drogues ont leur action cytotoxique en créant des dommages à l'ADN. D'autres part, aucune différence de sensibilité n'est apparente par rapport aux contrôles lorsque les cellules CA125-knockdown sont traitées avec des drogues qui affectent le fuseau mitotique, tel que le taxol et la vinorelbine, plutôt que l'ADN. Ces dernières drogues inhibent la dynamique des microtubules et, de ce fait, rend le fuseau mitotique incompetent à effectuer la mitose, empêchant la cellule cancéreuse de se diviser et la menant à l'apoptose (HERBST et KHURI, 2003; AGARWAL et KAYE, 2003).

## 20. Expression de surface de CA125 lors d'un traitement au cisplatine

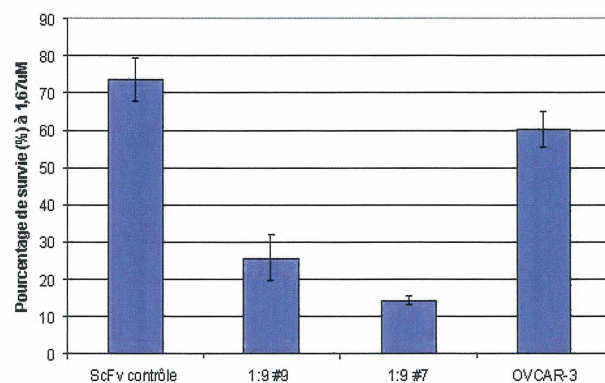
Après avoir constaté que la perte de CA125 à la surface des cellules entraîne une plus grande sensibilité des cellules aux agents génotoxiques, l'expression de surface de CA125 a été vérifiée lors du traitement des cellules avec une drogue génotoxique, le cisplatine. Le cisplatine a été choisi puisque c'est un agent chimiothérapeutique relativement stable, très utilisé en première ligne et que, dans notre cas, il était facile de s'en procurer. Donc, les quatre lignées cellulaires du clone scFv contrôle, de la lignée parentale OVCAR-3 et des clones CA125-knockdown 1:9 #9, 1:9 #7 ont été traitées ou non avec une faible concentration de cisplatine. Puisque la mort des cellules ne devait pas être atteinte, la concentration de cisplatine utilisée est de 0.1 µg/ml et représente une faible dose par rapport à

**Figure 7 : Sensibilité des cellules CA125-knockdown aux drogues de chimiothérapie.**

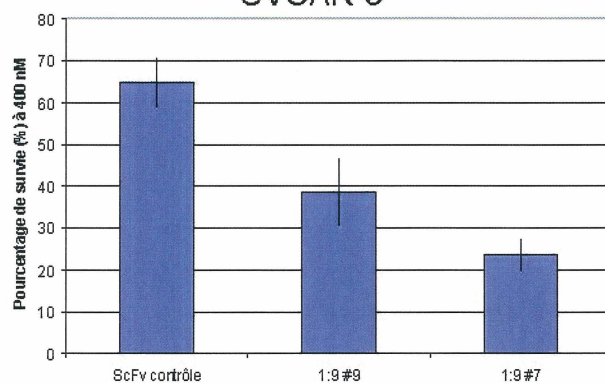
Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 15 000 cellules par puits et, 24 heures après, la drogue a été ajoutée en différentes concentrations. Après quatre jours d'exposition à la drogue, la mesure de viabilité par test XTT a été effectuée et les résultats ont été compilés sous forme d'histogrammes représentant le pourcentage de survie des cellules traitées à une concentration de drogue près de l'IC50 des cellules. En (A) cisplatine, en (B) cyclophosphamide, en (C) doxorubicine, en (D) étoposide, en (E) taxol et en (F) vinorelbine. L'histogramme du cisplatine montre la sensibilité des cellules OVCAR-3 à cette drogue, cette lignée contrôle ayant été omise dans les autres graphiques afin de les alléger. Comme attendu, la sensibilité de cette lignée aux différentes drogues a toujours été semblable à celle du clone scFv contrôle.



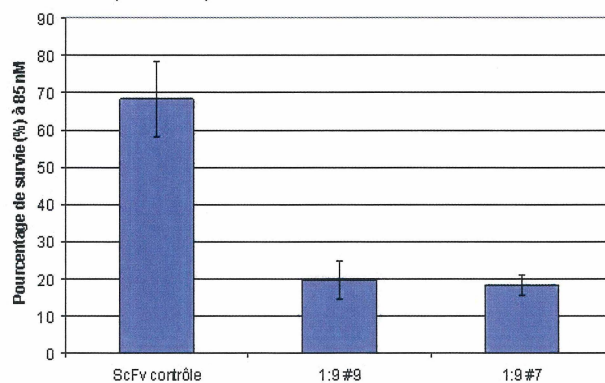
**A)** Sensibilité au cisplatine des cellules 1:9 #9, 1:9 7, scFv contrôle et OVCAR-3



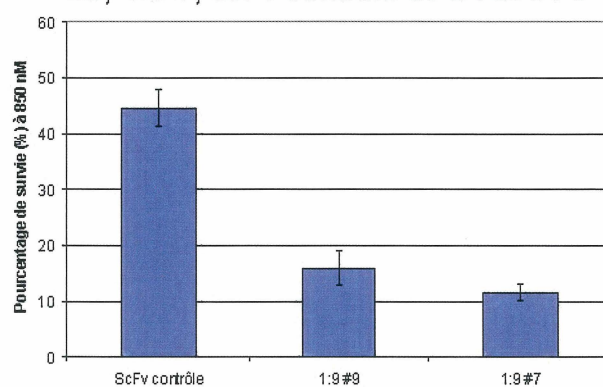
**B)** Sensibilité à la cyclophosphamide des cellules 1:9 #9, 1:9 7, scFv contrôle et OVCAR-3



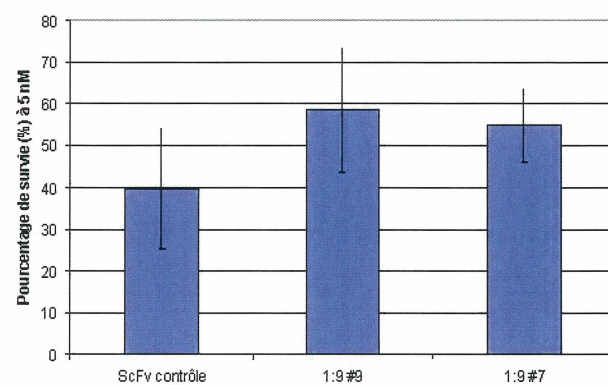
**C)** Sensibilité à la doxorubicine des cellules 1:9 #9, 1:9 7, scFv contrôle et OVCAR-3



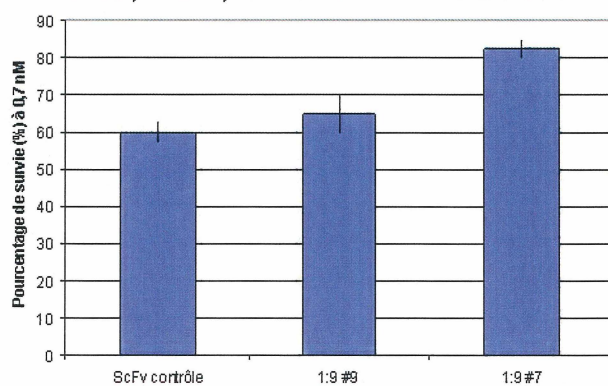
**D)** Sensibilité à l'étoposide des cellules 1:9 #9, 1:9 7, scFv contrôle et OVCAR-3



**E)** Sensibilité au taxol des cellules 1:9 #9, 1:9 7, scFv contrôle et OVCAR-3



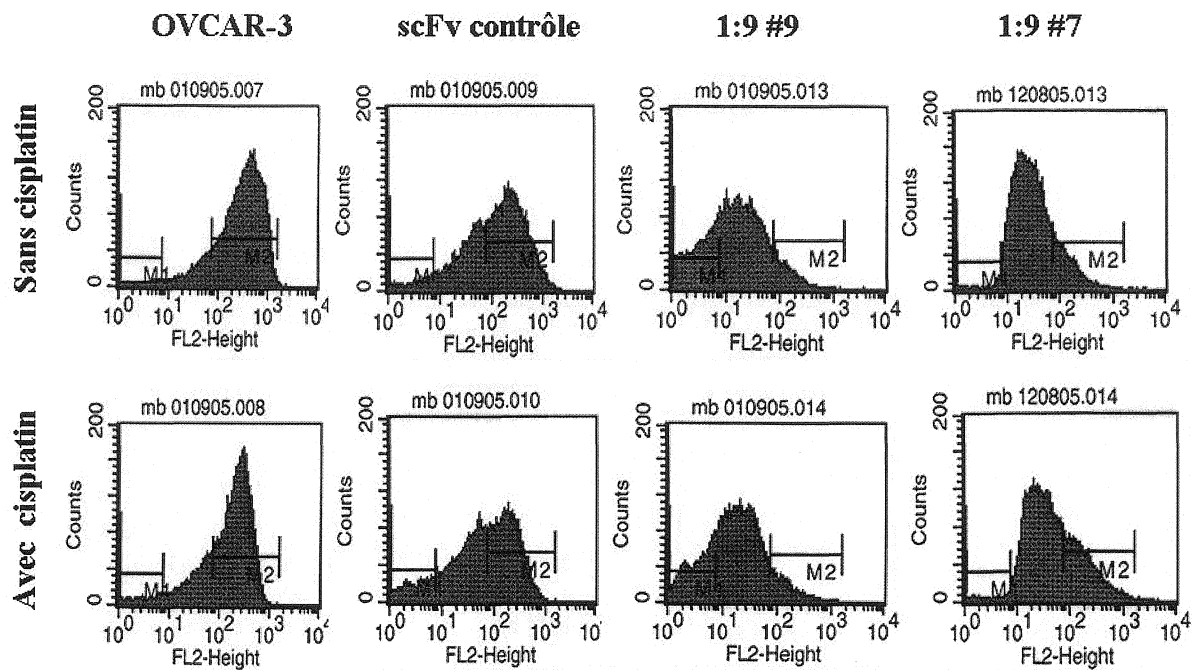
**F)** Sensibilité à la vinorelbine des cellules 1:9 #9, 1:9 7, scFv contrôle et OVCAR-3



l'IC50 des cellules. Les cellules ont ensuite été récoltées 24 heures après et l'expression de surface de CA125 a été analysée par cytométrie de flux. La figure 8 montre les spectres obtenus. On peut y voir en abscisses les comptes cellulaires et en ordonnée l'intensité de fluorescence. Pour les cellules contrôles de la lignée parentale OVCAR-3 et du clone scFv contrôle, on constate que les pics de fluorescence représentant l'expression de surface de CA125 sont autour de 500 et 275, respectivement. Lorsque ces cellules sont traitées au cisplatine, les pics de fluorescence demeurent sensiblement aux mêmes endroits, c'est-à-dire à 275 et 240, respectivement. Pour ce qui est des clones CA125-knockdown, on peut voir que, là-aussi, les pics de fluorescence ne se déplacent pas avec le traitement au cisplatine : pour le clone 1 :9 #9, le pic de fluorescence passe de 20 à 24, tandis que pour le clone 1 :9 #7, le pic de fluorescence passe de 15 à 25. Donc, l'absence de déplacement important des pics de fluorescence lorsque les cellules sont mises en présence de cisplatine indique que l'expression de surface de CA125 n'est pas modulée par cette drogue. On assume que le même résultat serait obtenu avec l'utilisation des autres drogues utilisées dans les tests de sensibilité précédents, ce qui reste toutefois à confirmer.

**Figure 8 : Expression de surface de CA125 après un traitement au cisplatine.**

Les cellules ont été traitées avec 0.1 µg/ml cisplatine pendant 24 heures, puis ont été fixées au paraformaldéhyde 2%. L'expression de surface de CA125 de ces cellules non-perméabilisées a ensuite été analysée par cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps monoclonal M11 dirigé contre CA125. Les régions M1 et M2 représentent les intensités de fluorescence. M2 représente l'étendue des intensités de fluorescence générée par la détection de CA125 à la surface des cellules. M1 représente la région de fluorescence de base générée par les contrôles négatifs utilisés lors de l'expérience (cellules incubées avec anticorps secondaire seulement).



## 21. Niveaux d'expression de base des molécules de la cascade apoptotique

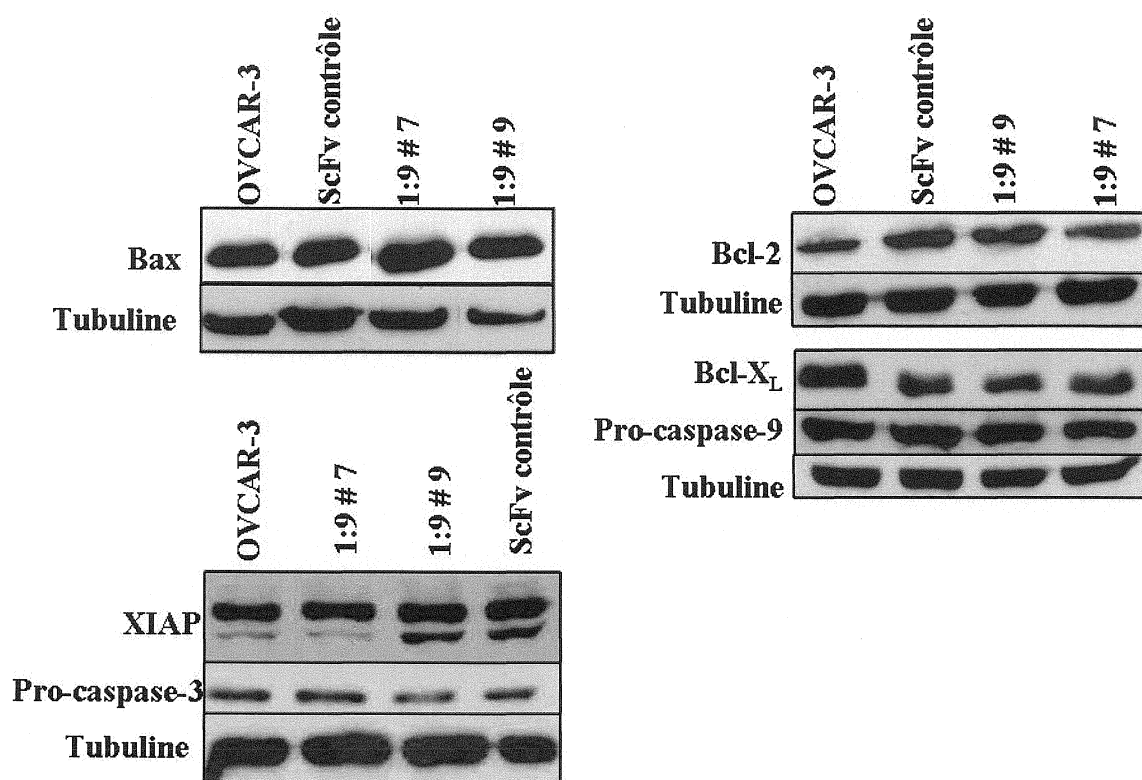
Les niveaux endogènes de différentes molécules de la cascade apoptotique ont été vérifiés par immunobuvardage de type western afin d'évaluer si la différence de sensibilité aux drogues génotoxiques pouvait être due à une différence dans les niveaux de base de ces protéines. Tel que montré à la figure 9, les niveaux de Bax, XIAP, pro-caspase-3, pro-caspase-9, Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> ont été comparés avec le contrôle interne de tubuline. Lors de ces analyses, aucune différence significative dans les niveaux d'expression de ces molécules n'a été rapportée concernant les cellules CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 comparativement aux contrôles de la lignée parentale OVCAR-3 et du clone scFv contrôle. Donc, ce n'est pas une différence dans les niveaux de base des molécules de la cascade apoptotique qui fait en sorte que les clones CA125-knockdown sont plus sensibles aux agents génotoxiques.

## 22. Mesure de l'activité basale de la caspase-3

L'activité de la caspase-3 a été mesurée afin de savoir si c'est une différence à ce niveau qui conduit à la différence de sensibilité aux agents génotoxiques des cellules CA125-knockdown. Lors de l'analyse par immunobuvardage de type western, il a été démontré que les niveaux endogènes de la pro-caspase-3 demeurent les mêmes chez les cellules contrôles et chez les cellules CA125-knockdown. Par contre, il serait possible que, chez les clones

**Figure 9 : Niveaux endogènes des molécules de la cascade apoptotique.**

Les cellules ont été lysées et une quantité égale de protéines a été déposée dans chaque puits d'un gel SDS-PAGE afin de procéder à l'analyse par immunobuvardage de type western. Les niveaux d'expression endogènes de Bax, XIAP, pro-caspase-3, pro-caspase-9, Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> des clones CA125-knockdown, du clone scFv contrôle et de la lignée parentale OVCAR-3 ont été évalués par rapport au contrôle interne de tubuline.



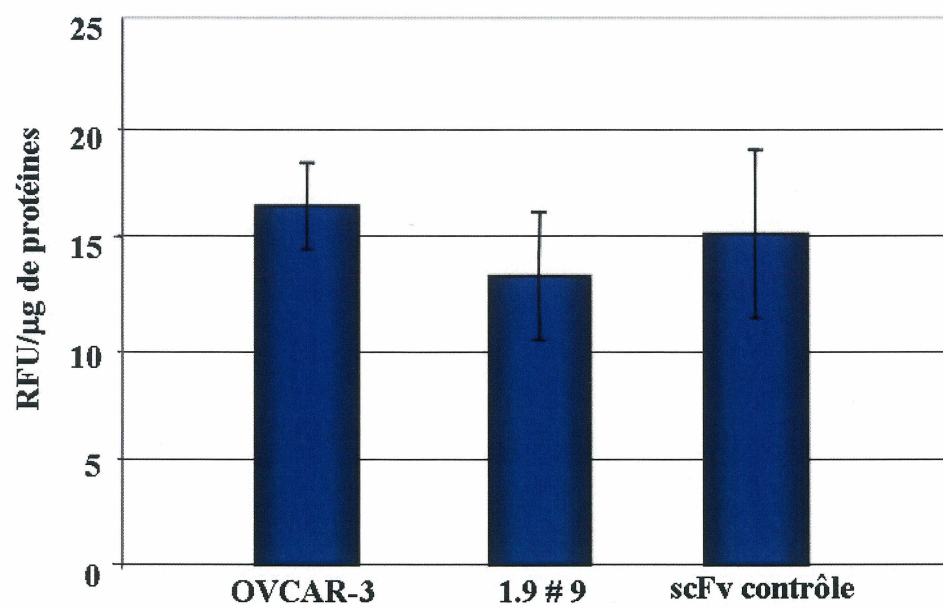


CA125-knockdown, il y ait surexpression de la caspase-3 couplée à une suractivation (par clivage) de cette caspase par rapport aux cellules contrôles. Dans ce cas, l'évaluation par immunobuvardage de type western des niveaux endogènes de pro-caspase-3 ne détecterait aucune différence, d'où l'importance de mesurer l'activité de cette dernière. Ce test implique l'utilisation d'un substrat synthétique fluorogénique de la caspase-3 imitant le site de clivage de PARP par la caspase-3. Lorsque la caspase-3 clive le substrat, un fluorochrome est libéré et cette fluorescence peut être mesurée à l'aide d'un fluorimètre. La figure 10 montre la mesure de l'activité de la caspase-3 du clone CA125-knockdown 1 :9 #9, du clone scFv contrôle et de la lignée parentale OVCAR-3. On constate qu'il n'y a pas de différence significative de l'activité de la caspase-3 dans le clone 1 :9 #9 par rapport aux cellules scFv contrôle et OVCAR-3. Ces résultats corrélerent avec l'analyse des niveaux endogènes de la pro-caspase-3 par immunobuvardage de type western où aucune différence dans les niveaux de base de cette protéine n'avait été détectée chez les cellules CA125-knockdown par rapport aux cellules contrôles. Donc, ce n'est pas une différence dans l'activité basale de la caspase-3 qui fait en sorte que les clones CA125-knockdown sont plus sensibles aux agents génotoxiques.

**Figure 10 : Mesure de l'activité basale de la caspase-3**

La mesure de la fluorescence dégagée lors du clivage du substrat synthétique fluorogénique de la caspase-3 est proportionnelle à l'activité de la caspase-3. Le graphique représente les unités de fluorescence relative (RFU) par microgrammes de protéines utilisés. Le clone 1 :9 #7 n'a pas été utilisé pour ce test puisqu'il n'avait pas été caractérisé à l'époque où ce test a été effectué. On présume que l'activité de la caspase-3 de ce clone est semblable au 1 :9 #9 puisque ces deux clones se comportent de la façon similaire dans toutes les expériences où ils sont impliqués.

**Activité basale de la caspase-3 des cellules 1:9 #9, scFv contrôle  
et OVCAR-3**

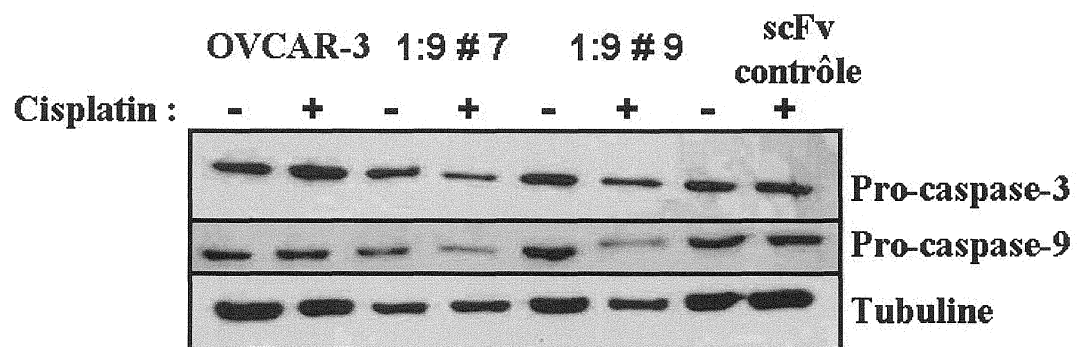


### 23. Niveaux d'activation de la caspase-9 et -3 après un traitement au cisplatine

La mesure de viabilité cellulaire par test XTT n'étant pas un indicateur de la mort cellulaire par apoptose, une vérification devait être faite afin de s'assurer que les cellules traitées au cisplatine mourraient bel et bien par apoptose. Les niveaux d'activation de la caspase-3 et de la caspase-9 ont donc été évalués afin de savoir si l'apoptose était activée lors d'un traitement au cisplatine. Les conditions de traitement utilisées sont une concentration de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de cisplatine pendant 96 heures. Cette dose est faible par rapport à l'IC<sub>50</sub> et le temps d'exposition est le même que lors des essais de mesure de viabilité cellulaire par XTT. Selon la figure 11, en comparaison avec le contrôle interne de tubuline, on constate qu'il n'y a pas de variation des niveaux des pro-caspases lors du traitement au cisplatine des cellules contrôles OVCAR-3 et scFv contrôle par rapport aux cellules non-traitées. Par contre, les niveaux des pro-caspases-3 et -9 diminuent lors du traitement au cisplatine des clones CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1:9 #7 par rapport aux cellules non-traitées. La diminution de l'intensité des bandes de pro-caspases suggère que ces pro-caspases sont clivées et donc activées et montre que les cellules meurent par apoptose. Le fait que la caspase-9 soit activée propose que la voie mitochondriale de l'apoptose est impliquée. Par contre, on ne peut rejeter la possibilité de l'implication de la voie des récepteurs de mort cellulaire, de même que l'implication de molécules en amont des caspases-3 et -9. Le clivage plus précoce de la caspase-3 et de la caspase-9 chez les clones CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 lorsqu'ils sont traités au cisplatine corréle avec le fait que ces cellules soient plus sensibles à cette drogue.

**Figure 11 : Activation de la caspase-3 et de la caspase-9 lors d'un traitement au cisplatine.**

Les cellules ont été traitées avec 0.1  $\mu\text{g/ml}$  cisplatine pendant 96 heures puis elles ont été lysées. Les échantillons ont été migrés sur gel SDS-PAGE 12%. Une quantité égale de protéines a été mise dans chaque piste, tel que confirmé par le contrôle interne de tubuline. Une diminution de l'intensité de la bande de pro-caspase suggère son activation.



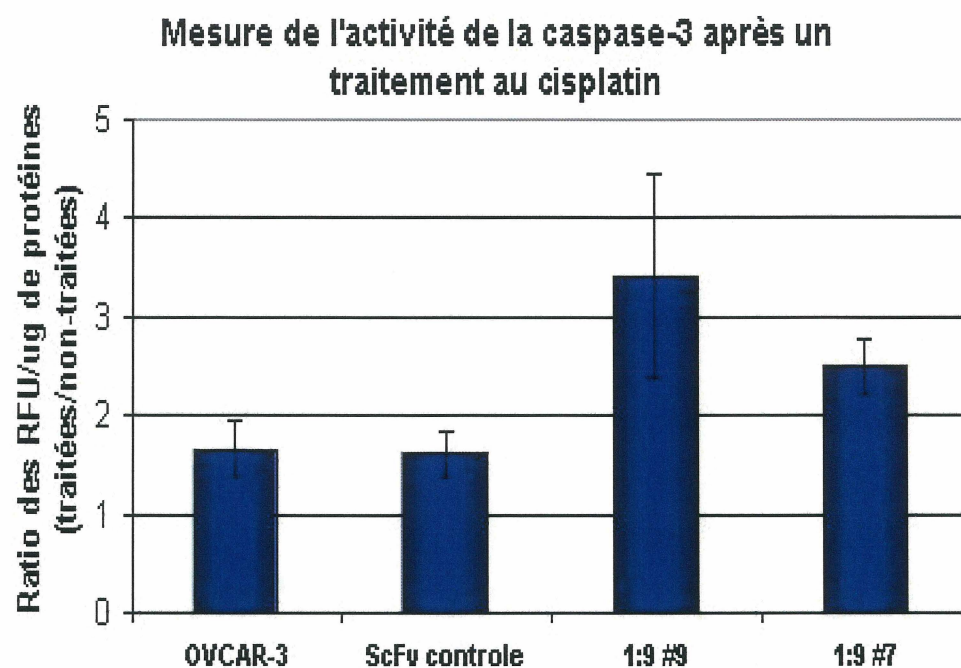
## 24. Mesure de l'activité de la caspase-3 après un traitement au cisplatine

Lors de l'expérience précédente, la diminution de la bande de pro-caspase-3 lors du traitement au cisplatine ne fait que suggérer que cette caspase est active. En fait, la caspase-3 pourrait être clivée mais non activée (SHI, 2002). Une mesure de l'activité de la caspase-3 a donc été faite après avoir traité les cellules avec 0.4 µg/ml de cisplatine pendant 24 heures afin d'attester que la caspase-3 est active. La figure 12 montre un histogramme représentant les ratios des RFU/µg de protéines des cellules traitées sur les cellules non-traitées. Ce ratio indique le nombre de fois que la caspase-3 est activée lors du traitement au cisplatine par rapport aux cellules non-traitées. Les cellules contrôles OVCAR-3 et scFv contrôle ont des ratios d'activation de la caspase-3 d'environ 1.5. D'autre part, les clones CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 ont un ratio d'activation de la caspase-3 de 3.4 et 2.5, respectivement. La différence entre les ratios des cellules contrôles versus les cellules CA125-knockdown, quoique petite, doit être considérée comme valable, puisque les écarts types ne se recoupent pas. Donc, cette expérience confirme que la caspase-3 est activée lorsqu'elle est clivée suite au traitement au cisplatine. De plus, la plus grande activation de la caspase-3 dans les clones CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 par rapport aux cellules contrôles lors d'un traitement au cisplatine corréle avec le fait que ces cellules soient plus sensibles à cette drogue.

**Figure 12 : Activité de la caspase-3 après traitement au cisplatine.**

L'histogramme représente les ratios des RFU/ $\mu$ g de protéines des cellules traitées sur les cellules non-traitées. Ce ratio indique le nombre de fois que la caspase-3 est activée lors du traitement au cisplatine par rapport aux cellules non-traitées. Le traitement s'est effectué dans les conditions de cisplatine d'une concentration de 0.4  $\mu$ g/ml de cisplatine et pendant une période de 48 heures.



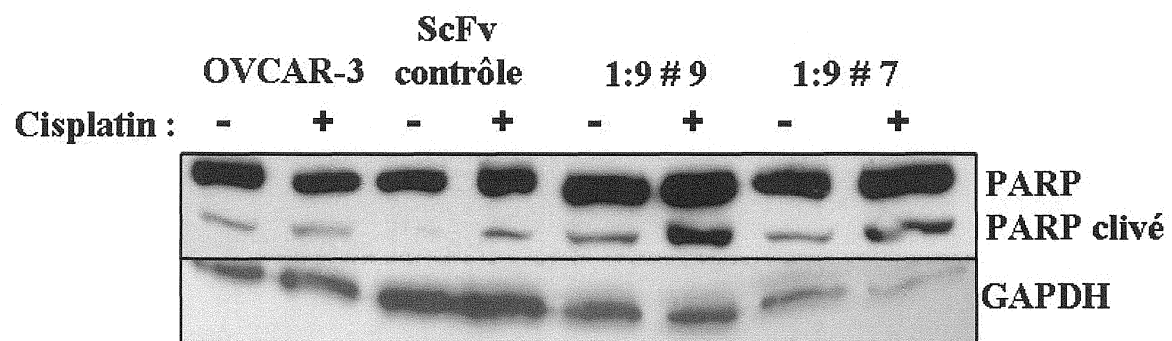


## 25. Mesure du clivage de PARP après un traitement au cisplatine

La différence entre les ratios d'activation de la caspase-3 des cellules CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 par rapport aux cellules contrôles lors d'un traitement au cisplatine est, selon les écarts types, significative. Toutefois, cette maigre différence a-t-elle une signification biologique? Pour répondre à cette question, le clivage de PARP, un substrat naturel de la caspase-3, a été évalué par immunobuvardage de type western. La figure 13 montre le clivage de PARP comparé avec le contrôle interne de GAPDH. Lors du traitement au cisplatine dans les mêmes conditions que pour la mesure de l'activité de la caspase-3, les clones CA125-knockdown montrent plus de PARP clivé par rapport aux cellules contrôle OVCAR-3 et scFv contrôle. Il peut sembler y avoir un clivage non-négligeable de PARP lors du traitement au cisplatine du clone scFv contrôle. Par contre, en comparant avec les bandes du contrôle interne de GAPDH, on constate qu'une plus grande quantité de protéines avait été mise sur gel dans la piste du clone scFv contrôle traité. Donc, le fait qu'il y ait un clivage plus important de PARP dans les cellules CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 lorsqu'elles sont traitées au cisplatine, comparativement aux cellules contrôles corrèle avec les résultats d'activation et d'activité de la caspases-3. Donc, la légère hausse, obtenue par le test fluorogénique, du ratio d'activité de la caspase-3 des cellules 1 :9 #9 et 1 :9 #7 par rapport aux cellules contrôles est suffisante pour avoir un effet biologique dans la cellule.

**Figure 13 : Clivage de PARP lors d'un traitement au cisplatine.**

Les cellules ont été traitées avec 0.4 µg/ml de cisplatine pendant 48 heures puis les cellules adhérentes et en suspension ont été lysées. Les échantillons ont été migrés sur gel SDS-PAGE 7.5%. La quantité de protéines mise sur gel dans chaque piste peut être évaluée à l'aide du contrôle interne de GAPDH.

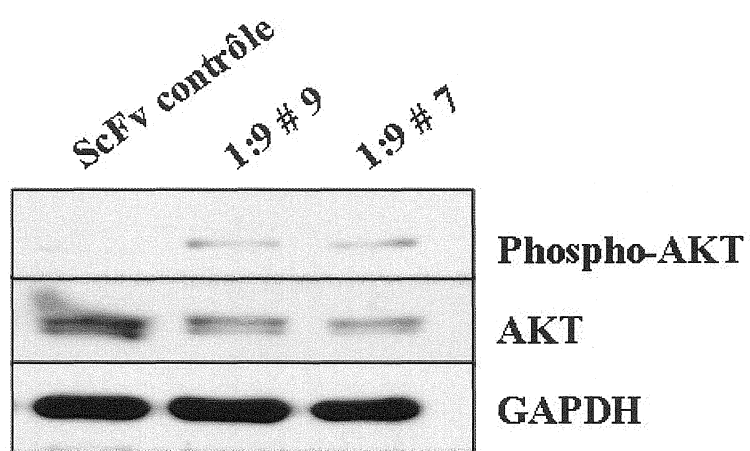


## 26. Niveaux endogènes de AKT et P-AKT

La voie PI3K/AKT est la principale voie de survie cellulaire (SEN et al, 2003). Lors d'un stimulus de croissance, PI3K permet l'activation de AKT, une kinase qui promouvoit la survie, la prolifération, la motilité et la croissance cellulaire, l'angiogénèse et le métabolisme du glucose (SEN et al, 2003, OSAKI et al, 2004). Cette voie a été étudiée afin de vérifier si la plus grande sensibilité des cellules CA125-knockdown aux agents génotoxiques pouvait être due à une différence dans les voies de survie de ces cellules. Généralement, la première voie de survie examinée dans ce type de situation est la voie PI3K/AKT puisqu'elle est centrale et influence beaucoup de voies de signalisation. Les niveaux endogènes de AKT et de AKT phosphorylé (P-AKT) ont donc été analysés par immunobuvardage de type western et comparés au contrôle interne de GAPDH. À la figure 14, on constate qu'il y a plus de AKT dans le clone scFv contrôle que dans les clones CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7. En comparant ces niveaux avec les niveaux de P-AKT, on constate que les clones 1 :9 #9 et 1 :9 #7 expriment d'avantage de P-AKT que le clone scFv contrôle.

**Figure 14 : Niveaux d'expression de base de AKT et P-AKT.**

L'immunobuvardage de type western a été effectué avec des lysats des cellules 1 :9 #9, 1 :9 #7 et scFv contrôle contenant des inhibiteurs de phosphatases. Les cellules récoltées ont été cultivées dans du milieu avec sérum et avaient atteint une confluence de 80%. Une quantité égale de protéines a été déposée dans chaque puits, tel que confirmé par le contrôle interne de GAPDH, et les échantillons ont été migrés sur gel SDS-PAGE 12%.



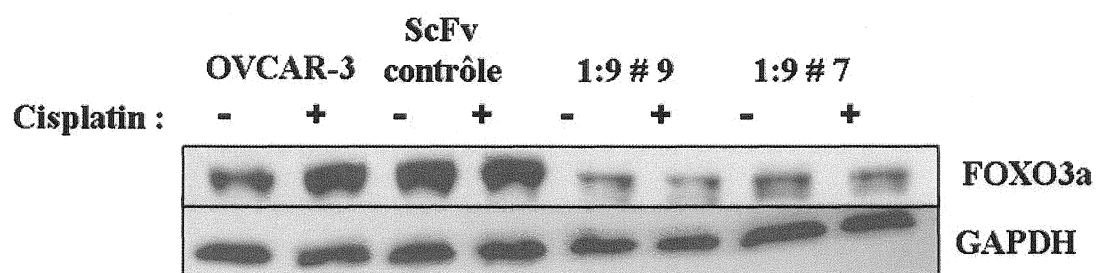
## 27. Niveaux endogènes de FOXO3a

L'augmentation de P-AKT dans les cellules CA125-knockdown 1 :9 #9 et 1 :9 #7 a permis d'identifier une voie dans laquelle CA125 pourrait être impliquée. En se référant au mécanisme de signalisation de MUC1 qui atténue la voie PI3K/AKT et la phosphorylation de FOXO3a dans un contexte de cancer, les niveaux d'expression endogène de FOXO3a ont été vérifiés par immunobuvardage de type western (YIN et al, 2004; YIN et al, 2003). Lorsque le facteur de transcription FOXO3a est phosphorylé par AKT, il est retenu au cytoplasme par des protéines chaperonnes et ne peut transloquer au noyau alors que, lorsqu'il est hypophosphorylé, il transloque au noyau et exerce son activité transcriptionnelle (KOPS et BURGERING, 1999; SKURK et al, 2004). Des gènes impliqués dans la réponse au stress et dans la réparation de l'ADN lésé par les ROS sont des gènes cibles de FOXO3a (LIU et al, 2005, SUNTERS et al, 2003). Les cellules CA125-knockdown, scFv contrôle et OVCAR-3 ont été traitées avec 0.4 µg/ml de cisplatine pendant 48 heures afin de voir si ce traitement avait un effet sur les niveaux de FOXO3a. Tel que montré à la figure 15, l'expression de FOXO3a est fortement diminuée chez les clones CA125-knockdown par rapport aux cellules scFv contrôle et OVCAR-3. Par contre, les niveaux de FOXO3a ne semblent pas être affectés par ce traitement des cellules au cisplatine. Ces résultats indiquent que FOXO3a pourrait potentiellement être impliqué dans la sensibilisation des cellules CA125-knockdown aux agents génotoxiques puisque son expression est différente chez les clones CA125-knockdown par rapport aux contrôles.



**Figure 15 : Niveaux d'expression endogènes de FOXO3a.**

L'immunobuvardage de type western des niveaux d'expression de base de FOXO3a a été effectué avec des lysats de cellules traitées ou non avec 0.4 µg/ml de cisplatine pendant 48 heures puis migrés sur gel SDS-PAGE 7.5%. Une quantité égale de protéine a été déposée dans chaque puits, comme confirmé par le contrôle interne de GAPDH.

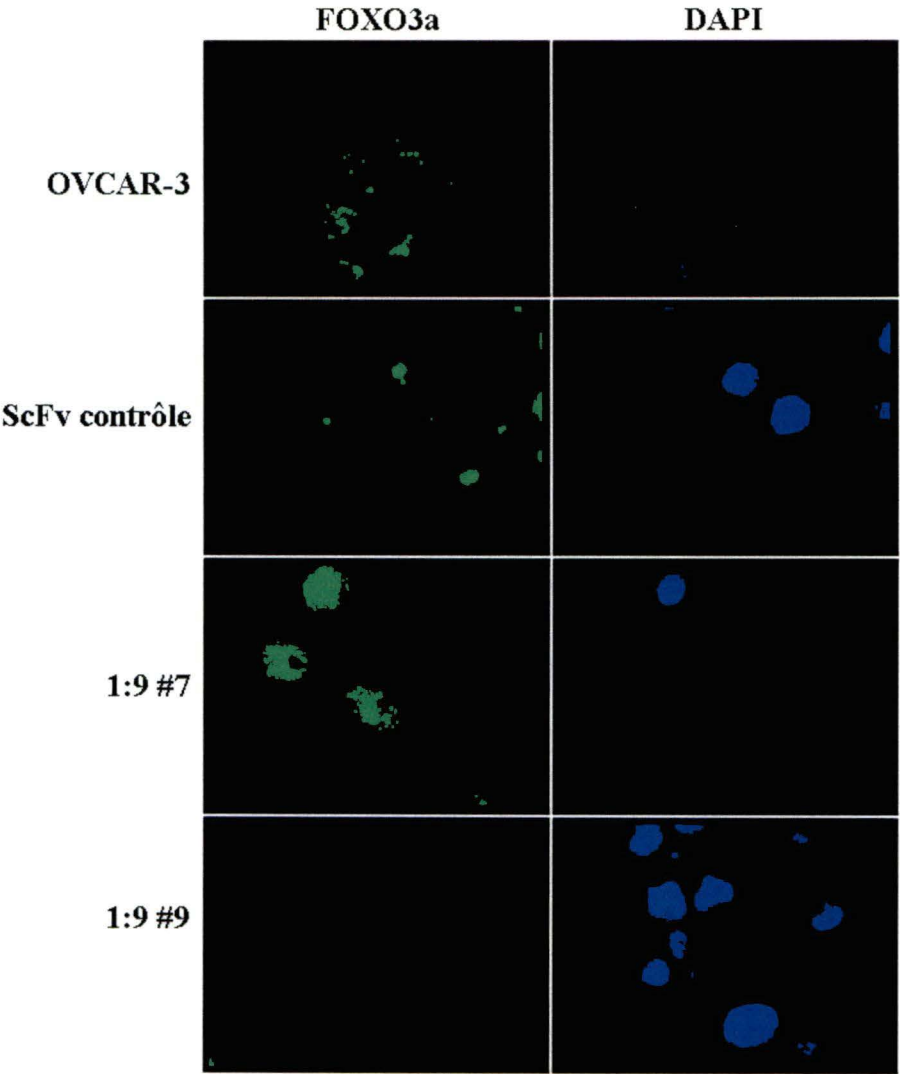


## 28. Localisation cellulaire de FOXO3a

L'état de phosphorylation et la localisation cellulaire de FOXO3a dicte si ce facteur de transcription est actif et apte à remplir son rôle transcriptionnel. La localisation de FOXO3a chez les clones 1 :9 #9, 1 :9 #7, scFv contrôle et la lignée parentale OVCAR-3 a été vérifiée par immunofluorescence indirecte sur lame (Voir figure 16). Le signal en vert indique la localisation de FOXO3a et le signal en bleu désigne l'emplacement des noyaux par coloration de l'ADN avec le DAPI. Tout d'abord, en regardant la localisation de FOXO3a chez la lignée parentale et le clone scFv contrôle, on constate qu'elle est majoritairement nucléaire, puisqu'elle colocalise avec la coloration du noyau. Cette localisation au noyau est plus exclusive chez le clone scFv contrôle, quoiqu'il y ait très peu de FOXO3a cytoplasmique chez la lignée parentale. Chez les clones CA125-knockdown, la localisation de FOXO3a apparaît différente de ce qu'on observe chez les contrôles. Chez le clone 1 :9 #9, la localisation de FOXO3a est totalement cytoplasmique et il y a pratiquement absence de signal nucléaire. L'interprétation de la localisation de FOXO3a chez le clone 1 :9 #7 est plus nuancée. La localisation de FOXO3a est nucléaire et cytoplasmique chez ces cellules, mais, contrairement aux cellules contrôles, la majorité du signal de FOXO3a n'est pas au noyau, mais au cytoplasme.

**Figure 16 : Localisation cellulaire de FOXO3a par immunofluorescence indirecte sur lame.**

Les cellules ont étéensemencées sur des lames et, lors de l'atteinte d'une confluence d'environ 80%, elles ont été fixées au paraformaldéhyde 3.7%. Les cellules ont ensuite été perméabilisées et marquées à l'aide du DAPI et d'un anticorps contre FOXO3a. En vert : FOXO3a, en bleu : emplacement du noyau par coloration de l'ADN par le DAPI. Objectif 100X sur microscope Olympus 1X70.



## 29. Constructions des plasmides pour le Tandem Affinity Purification (TAP)

Le TAP, ou tandem affinity purification, est une méthode d'identification de partenaires d'interaction qui peut servir pour des études à grande échelle (FORLER et al, 2003). C'est une approche basée sur la purification d'une protéine par affinité, en deux étapes, à l'aide de deux étiquettes peptidiques exprimées en fusion avec la protéine d'intérêt. Cette stratégie augmente la spécificité et l'efficacité de purification et permet la détermination des partenaires d'interaction et fonctions de la protéine (FORLER et al, 2003; SHEVCHENKO et al, 2002; PUIG et al, 2001). Cette technique a aussi l'avantage de permettre l'utilisation de plusieurs lignées cellulaires différentes et d'obtenir des niveaux d'expression physiologique de la protéine chez les cellules transfectées (RIGAUT et al, 1999; OBUNGU et al, 2003). De plus, grâce à ce type de constructions, il est possible de faire des études de gain de fonction d'une protéine, ce qui est complémentaire au modèle utilisé dans le laboratoire jusqu'à maintenant consistant en les clones CA125-knockdown. Le modèle de TAP élaboré dans le laboratoire est représenté à la figure 17A. Ce TAP requiert des constructions d'ADN qui, lorsque transfectées dans des cellules eucaryotes, permettront la production de différents domaines de CA125 exprimés en fusion avec deux étiquettes peptidiques c-myc et polyhistidine. La figure 17B montre les différentes constructions du TAP : MUC16-TMcyto, qui contient les domaines cytoplasmique et transmembranaire de CA125, MUC16-Unique qui contient le domaine unique de CA125 et, finalement, MUC16-CTD, qui contient les domaines cytoplasmique, transmembranaire et unique de CA125. Les plasmides utilisés sont pSTCF secrété linker et pSTCF cyto linker, le premier permettant à

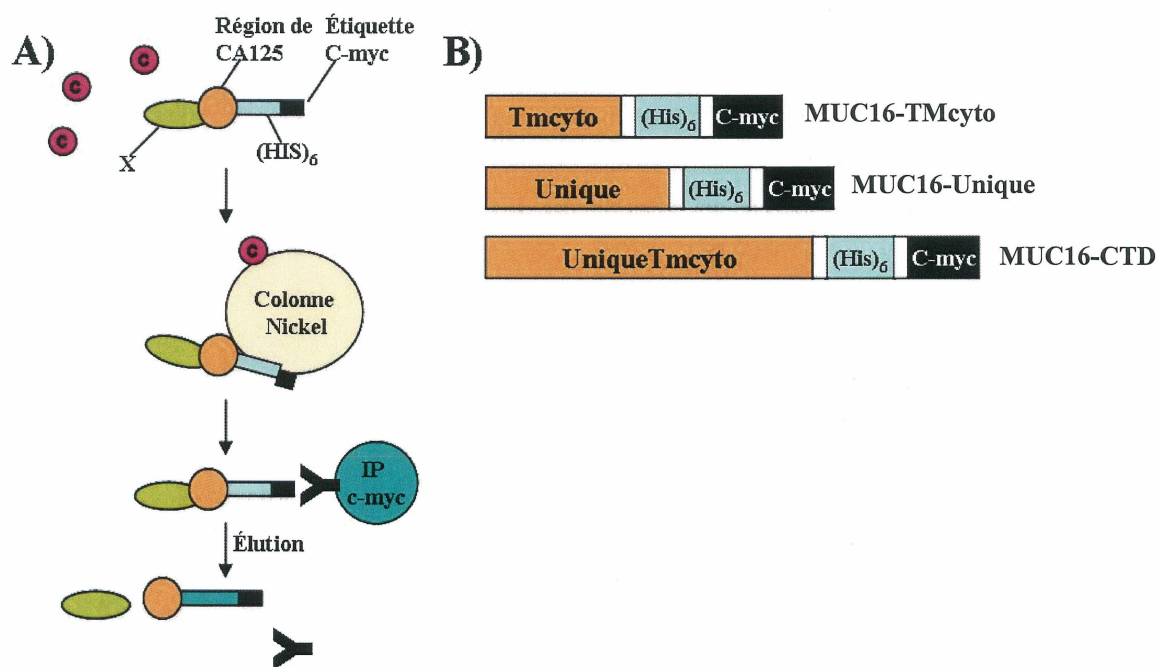
la protéine produite de passer par la voie de sécrétion et le deuxième permettant la production d'une protéine cytoplasmique. Les domaines MUC16-CTD et MUC16-Unique ont été cloné dans la version sécrété du vecteur pSTCF qui ajoute un signal de sécrétion à la protéine recombinante et permet l'ajout des modifications post-traductionnelles sur le domaine unique de CA125 lors de son passage dans la voie de sécrétion. La construction MUC16-TMcyto a été clonée dans le vecteur pSTCF cyto linker, les domaines transmembranaire et cytoplasmique ne nécessitant pas de modifications post-traductionnelles.

À l'aide du plasmide pME18S-FL3 (GenBank AB009864) contenant la séquence du FLJ14303, les différentes séquences d'ADN nécessaires au clonage ont été amplifiées par PCR. À la figure 18, on peut voir les produits de PCR qui ont été migrés sur gel d'agarose. Les domaines de CA125 des produits de PCR sont en (A) TMcyto, en (B) Unique et en (C) UniqueTMcyto (CTD). Comparées avec le standard de poids moléculaire, les bandes obtenues sur gel d'agarose ont le poids moléculaire attendu, c'est-à-dire 168 pb, 687 pb et 855 pb respectivement.

**Figure 17 : Modèle du Tandem Affinity Purification.**

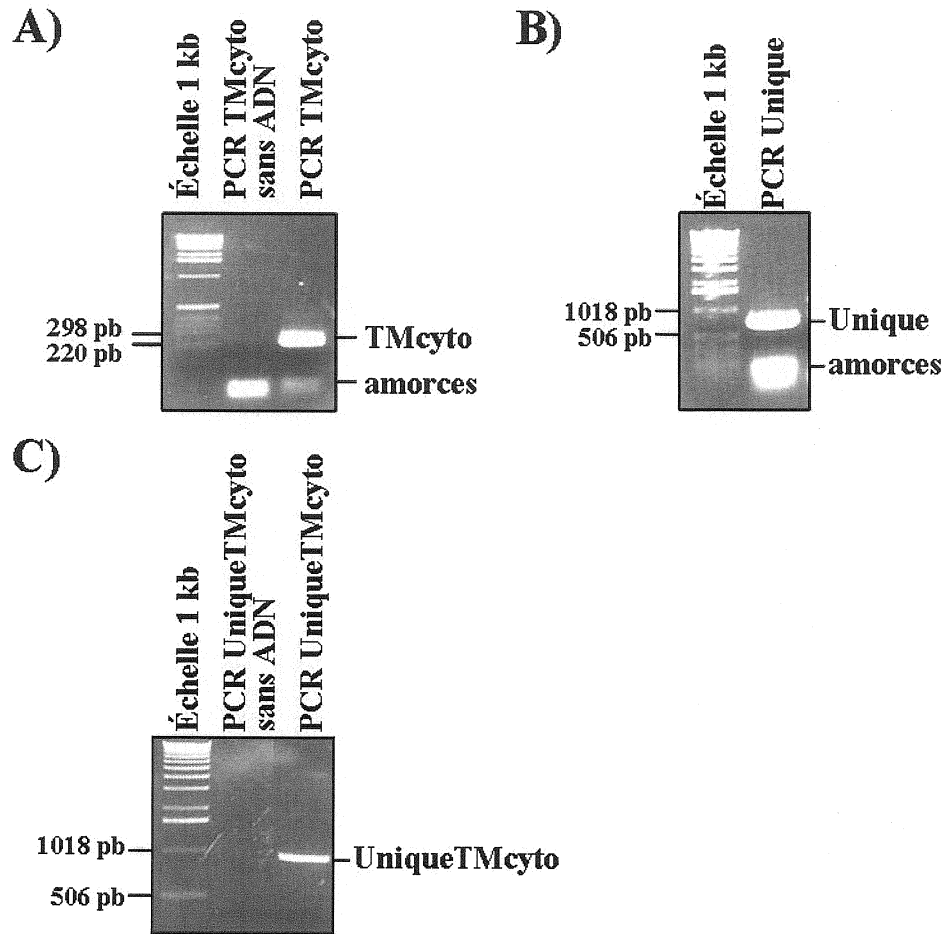
En (A), le TAP élaboré dans le laboratoire. Des domaines de CA125 sont exprimés en fusion avec les étiquettes c-myc (C-myc) et polyhistidine [(His)<sub>6</sub>]. Ces étiquettes permettent de faire deux purifications successives de la protéine : une purification par colonne de nickel et une immunoprécipitation contre l'étiquette c-myc, récoltant ainsi les complexes protéiques dans lesquels CA125 est impliqué. En (B), les trois constructions du TAP : MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD. C: contaminant. X: partenaire d'interaction de CA125.





**Figure 18 : Amplification des inserts pour le clonage de MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD.**

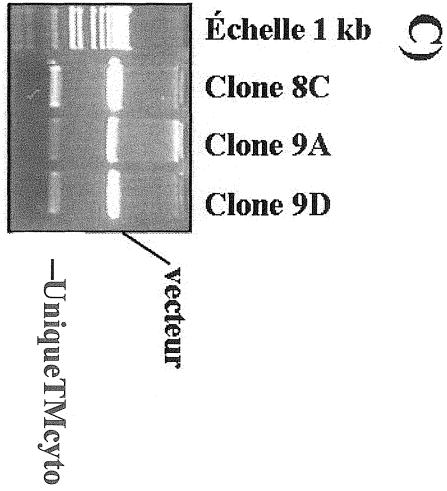
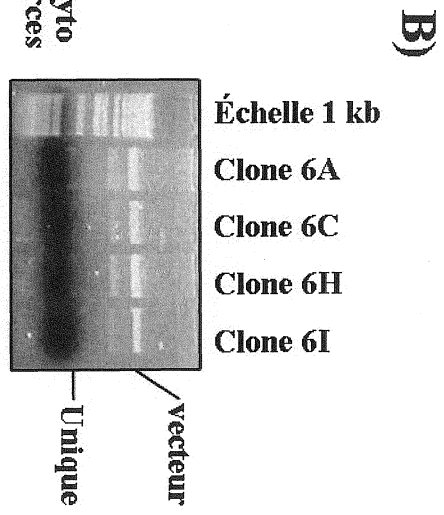
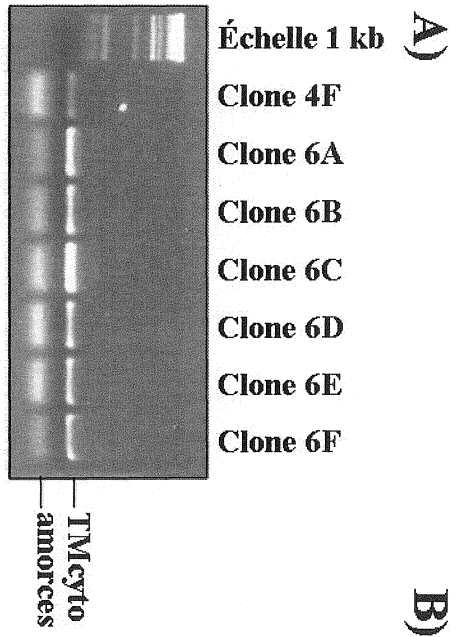
Les produits de PCR ont été migrés sur gel d'agarose parallèlement à un standard de poids moléculaire : les domaines TMcyto en (A), Unique en (B) et UniqueTMcyto (CTD) en (C).



Après avoir obtenu les différents produits de PCR, les clonages ont été effectués afin d'obtenir les constructions pSTCF cyto MUC-16-TMcyto, pSTCF secrété MUC16-Unique et pSTCF secrété MUC16-CTD. Ces constructions seront à l'avenir appelées MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD respectivement, afin de simplifier la nomenclature. En résumé, les clonages ont été faits de la manière suivante : les inserts et les plasmides ont été digérés avec l'enzyme de restriction SfiI suivi de l'enzyme NotI, puis inserts et vecteurs digérés ont ensuite été ligués ensemble. Les produits de ligation ont par la suite été transformés par choc thermique dans des bactéries XL1 compétentes. Des colonies poussant sur le milieu sélectif pour les bactéries transformées ont été piquées pour tenter d'identifier des clones positifs. La figure 19 montre les produits de PCR (pour MUC16-TMcyto) et les produits de digestion (pour MUC16-Unique et MUC16-CTD) effectués à partir d'extrait d'ADN plasmidique provenant de bactéries des colonies sélectionnées. Les PCRs ont été effectués à l'aide des mêmes amorces que lors de l'amplification de l'insert au début du processus de clonage. Les digestions ont été faites avec les enzymes SfiI et NotI. La validation des clones positifs des constructions est montrée en (A) pour MUC16-TMcyto, en (B) pour MUC16-Unique et en (C) pour MUC16-CTD. Pour chacune des trois constructions, plusieurs clones positifs ont été obtenus et un clone par construction a été sélectionné pour effectuer les étapes de validation par transfection dans des cellules eucaryotes.

**Figure 19 : Validation des clones positifs de MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD.**

Des colonies ont été piquées et les bactéries ont été incubées toute la nuit à 37 °C dans 5 ml de LB avec ampicilline, puis l'ADN plasmidique en a été extrait. Des PCR ont été faits à partir de ces ADN afin d'amplifier la séquence TMcyto, tandis que des digestions avec les enzymes SfiI et NotI ont été faites pour les construction MUC16-Unique et MUC16-CTD afin de trouver des transformants positifs. En (A), clones de colonies de la transformation MUC16-TMcyto. En (B), clones de colonies de la transformation MUC16-Unique. L'apparition de deux bandes dans la région désignée "vecteur" est le résultat de la digestion incomplète de ce vecteur. La bande correspondant à l'ADN du domaine unique est à la même hauteur que le front de migration du bleu de bromophénol (région sombre du gel d'agarose). En (C), clones de colonies de la transformation MUC16-CTD. Les clones positifs sélectionnés pour la validations dans un système eucaryote sont respectivement 6C, 6H et 8C.



### 29.1 Validation des constructions par transfection transitoire dans un modèle eucaryote

La validation des constructions MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD a tout d'abord été effectuée dans un système transitoire. La lignée cellulaire COS-7 a été choisie pour subir les transfusions transitoires puisqu'elle permet d'obtenir un bon pourcentage de cellules transfectées avec des agents de transfection classiques. Cette lignée n'est que faiblement positive pour CA125. Pour chaque expérience nécessitant une transfection transitoire, le pourcentage d'efficacité de transfection était évalué en transfectant des cellules parallèlement, et dans les mêmes conditions, avec le vecteur pAdTrack CMV. Ce vecteur entraîne la production de la protéine fluorescente GFP et permet ainsi de visualiser les cellules transfectées. En général, un pourcentage d'efficacité de transfection de 30% à 40% était obtenu, ce qui est satisfaisant.

En premier lieu, l'expression des protéines de fusion MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD a été vérifiée par immunobuvardage de type western. Comme nous ne disposons pas d'anticorps dirigé contre les domaines cytoplasmique, transmembranaire et unique de CA125, seule la présence du signal provenant des étiquettes polyhistidine et c-myc indique que la protéine de fusion est présente. La figure 20A montre les immunobuvardages de type western des lysats des cellules transfectées transitoirement pendant 72 heures. L'analyse du lysat des cellules COS-7 transfectées avec MUC16-TMcyto a permis l'obtention d'une bande vers les 20 à 25 kDa. L'analyse du lysat des cellules COS-7 transfectées avec MUC16-Unique a permis l'obtention d'une bande vers 45

kDa. Finalement, pour ce qui est du lysat des cellules COS-7 transfectées avec MUC16-CTD, plusieurs bandes sont visibles, mais la bande majoritaire est à 70 kDa. Les bandes observées pour les différentes constructions n'étaient pas présentes dans les pistes contrôles de lysat de cellules transfectées avec le vecteur vide. Une hybridation avec un anticorps contre la seconde étiquette peptidique de la protéine de fusion, la polyhistidine, a aussi été réalisée et donnait un signal semblable à celui obtenu avec l'anticorps anti-c-myc (non-montre). Par contre, les poids moléculaires des trois protéines de fusion obtenues en immunobuvardage de type western sont légèrement plus élevés que le poids théorique calculé. De façon fréquente, et selon les propriétés intrinsèques de chaque protéine, le poids moléculaire d'une protéine mesuré par électrophorèse n'est pas le même que celui attendu théoriquement. Le plasmide pSTCF cyto linker a été séquencé et a permis d'exclure la possibilité d'une erreur de cadre de lecture qui aurait pu allonger la séquence de la protéine produite. Cette expérience permet d'affirmer que les deux étiquettes peptidiques sont fonctionnelles, du moins lors d'une analyse de type immunobuvardage en condition dénaturante. Malgré la différence des poids apparents sur gel SDS-PAGE, ceci confirme que les constructions MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD sont valides et permettent l'expression des différents domaines de CA125 en fusion avec les étiquettes peptidiques.

Par la suite, une validation de la fonctionnalité des étiquettes en conditions natives a été effectuée par immunoprécipitation. Des immunoprécipitations ont été effectuées à l'aide des anticorps anti-polyhistidine et anti-c-myc avec des lysats provenant de COS-7 transfectées transitoirement avec les constructions MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et



MUC16-CTD et avec le contrôle pAdTrack CMV. La figure 20B montre ces immunoprécipitations après analyse par immunobuvardage de type western et hybridation avec l'anticorps dirigé contre la polyhistidine. Premièrement, toutes les bandes apparaissant à 55 kDa et 25 kDa représentent les anticorps utilisés lors des immunoprécipitations. La protéine TMcyto est immunoprécipitée avec les anticorps anti-c-myc et anti-polyhistidine et est visualisée à environ 22 kDa, quoique la bande immunoprécipitée avec l'anticorps contre c-myc soit très faible. Le lysat des cellules transfectées avec la construction du domaine unique permet l'obtention d'une protéine de 45 à 50 kDa immunoprécipitée à l'aide des anticorps contre c-myc et contre la polyhistidine. Ensuite, la protéine UniqueTMcyto (CTD) est aussi immunoprécipitée à l'aide de ces deux anticorps et apparaît à environ 70 kDa. Une bande supplémentaire d'environ 24 kDa est aussi obtenue lors de l'immunoprécipitation de UniqueTMcyto. Cette bande pourrait être le résultat d'un clivage protéolytique de manière juxta-membranaire à l'intérieur du domaine Unique de CA125, comme dans le cas de MUC1 (BRAYMAN et al, 2004; LILLEHOJ et al, 2003; THATHIAH et al, 2003). Quoique ce type de clivage ne soit pas répertorié chez CA125, il demeure toutefois possible. La bande à 24 kDa représenterait donc la portion comprenant les domaines cytoplasmique, transmembranaire et la portion résiduelle du domaine Unique. Le reste du domaine Unique ne peut être détecté puisque l'étiquette polyhistidine est situé en C-terminale de la protéine de fusion. Pour ce qui est du contrôle négatif provenant de cellules transfectées avec pAdTrack CMV, aucune bande n'est apparente dans les pistes des immunoprécipitations contre c-myc et contre polyhistidine, en faisant exception des bandes des anticorps. Donc, ces immunoprécipitations de MUC16-CTD, MUC16-Unique et MUC16-TMcyto confirme la fonctionnalité des étiquettes c-myc et polyhistidine en conditions non-dénaturantes. De

plus, les poids moléculaires des protéines immunoprécipitées corréleront avec les poids obtenus lors de l'analyse des lysats par immunobuvardage de type western.

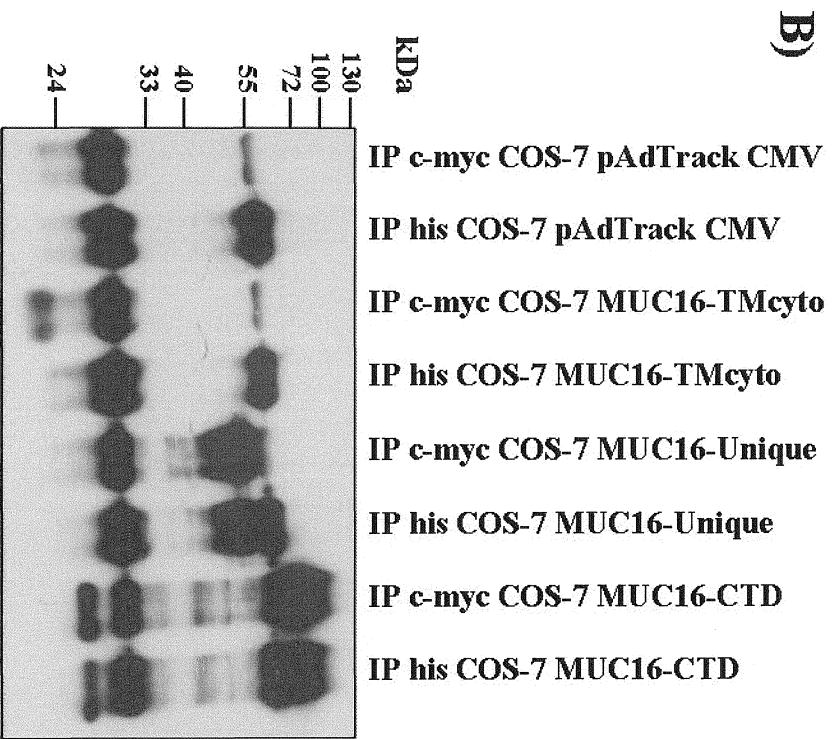
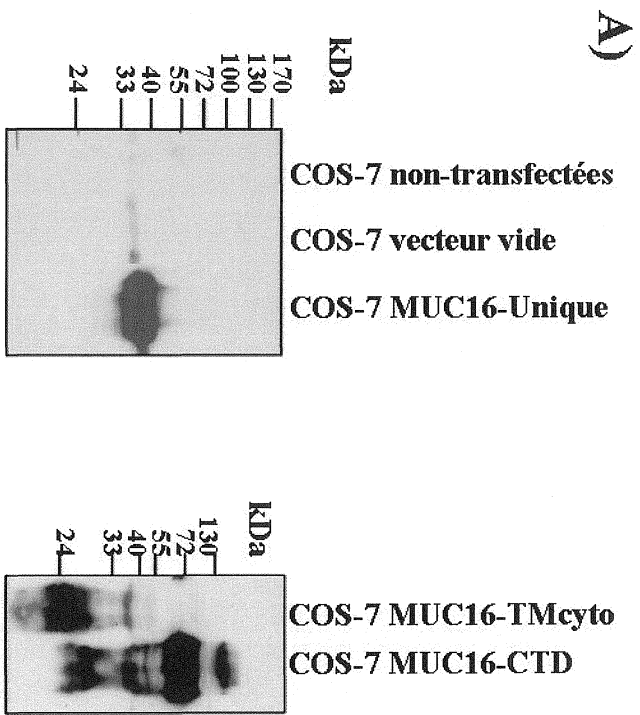
## 29.2 Validation de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD

Pour éviter de faire des transfections transitoires à répétition, des populations stables ont été générées avec la lignée de cancer de l'ovaire SKOV-3, qui est CA125-négative. La construction utilisée pour faire une population stable est MUC16-CTD. La raison pour laquelle cette construction en particulier a été choisie est que, dans le cas de MUC1, l'ajout de fonction des domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de MUC1 est suffisant pour permettre aux cellules d'être plus résistantes aux agents génotoxiques (REN et al, 2004). Des populations stables ont été générées au lieu de clones stables puisque la population stable a comme avantage d'être homogène tout en étant générée via plusieurs cellules transfectées avec un même ADN. Donc, lors d'analyse de phénotypes par exemple, si une minorité des cellules de la population stable a un comportement différent par rapport à toutes les autres cellules, ce comportement sera noyé par le comportement majoritaire de la population stable entière.

Les populations stables ont été générées en transfectant les cellules SKOV-3 avec 2 µg du vecteur vide pSTCF sécrété linker ou de la construction MUC16-CTD préalablement linéarisés avec l'enzyme de restriction PvuI. Par la suite, les cellules dont le plasmide

**Figure 20 : Validation des constructions du TAP dans un système eucaryote transitoire.**

Des cellules COS-7 ont été transfectées transitoirement avec les constructions MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD et elles ont été lysées 72 heures plus tard. En (A), les immunobuvardages de type western de ces lysats. Des cellules transfectées avec le vecteur vide servent de contrôles. Les immunobuvardage ont été hybridés avec l'anticorps anti-c-myc. En (B), les immunoprécipitations des protéines TMcyto, Unique et UniqueTMcyto (CTD) faites avec des anticorps dirigés contre les étiquettes c-myc et polyhistidine. L'immunobuvardage de type western a été hybridé avec l'anticorps anti-polyhistidine. Les immunoprécipitations contrôles ont été effectuée avec des cellules transfectées avec le vecteur pAdTrack CMV.



linéarisé a pu s'intégrer à l'ADN génomique ont été sélectionnées avec la Zéocine. Après 22 jours de sélection, lorsque toutes les cellules du contrôle de transfection sans ADN ont été tuées par la Zéocine, les populations stables SKOV-3 MUC16-CTD et SKOV-3 vecteur vide ont été amplifiées.

La validation de la population stable a premièrement été effectuée par RT-PCR pour vérifier l'expression de l'ARNm de la protéine de fusion de Unique<sup>TM</sup>cyto (CTD). Des extractions d'ARNs des populations stables SKOV-3 vecteur vide et SKOV-3 MUC16-CTD ont été faites, puis, après une réaction de transcription inverse, la séquence des domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125 a été amplifiée à l'aide des amorces utilisées pour le clonage de la construction MUC16-CTD. L'analyse sur gel d'agarose du produit de RT-PCR, présenté à la figure 21A, montre qu'il y a absence de l'ARNm des domaines Unique<sup>TM</sup>cyto (CTD) dans la population stable contrôle SKOV-3 vecteur vide. Puisqu'il n'y a pas détection de l'ARNm de ces domaines de CA125 dans la population contrôle, ce RT-PCR confirme que la lignée SKOV-3 est CA125-négative. Par opposition, la population stable SKOV-3 MUC16-CTD exprime l'ARNm des domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125, tel que démontré par la présence de la bande à environ 950 bp. Les domaines de MUC16-CTD, en plus des deux étiquettes, ont théoriquement 942 pb, ce qui corrèle avec ce qu'on obtient sur gel d'agarose. La hauteur de cette bande est la même que dans la piste du contrôle positif correspondant à l'amplification des domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125 via le plasmide pME18S-FL3 contenant le FLJ14303. Donc, l'ARNm de MUC16-CTD est bel et bien exprimé dans la population stable SKOV-3 MUC16-CTD et cette expression est due à la construction MUC16-CTD

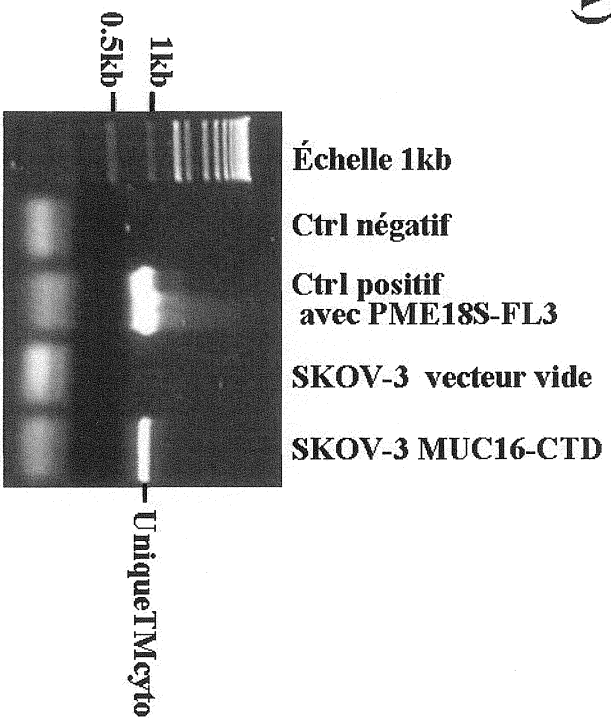
puisque la population stable contrôle SKOV-3 vecteur vide n'exprime pas l'ARNm de la protéine de fusion.

La vérification de l'expression de la protéine recombinante MUC16-CTD dans la population stable MUC16-CTD a ensuite été accomplie. Pour ce faire, des immunoprécipitations ont été effectuées puisque l'analyse d'un lysat cellulaire de la population stable par immunobuvardage de type western ne permettait pas la détection de la protéine de fusion, probablement à cause de la faible quantité de protéine produite dans la cellule. Une immunoprécipitation permet de concentrer la protéine d'intérêt et ainsi d'en déposer plus sur gel SDS-PAGE pour fin d'analyse. La figure 21B montre les immunoprécipitations faites avec des lysats des populations stables SKOV-3 vecteur vide et SKOV-3 MUC16-CTD. Pour chacun de ces lysats, trois immunoprécipitations ont été faites : une contre l'étiquette c-myc, une contre l'étiquette polyhistidine et une immunoprécipitation contrôle utilisant des IgG normales de souris. Dans les immunoprécipitations de SKOV-3 vecteur vide, les seules bandes visibles sont celles des chaînes lourdes et légères des anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation. Pour les immunoprécipitations avec le lysat de SKOV-3 MUC16-CTD, une faible bande est apparente juste au-dessus de la bande de la chaîne lourde des anticorps, c'est-à-dire vers les 60 à 70 kDa, correspondant au poids obtenu lors des expériences de validation de MUC16-CTD dans le système transitoire. Donc, cette expérience confirme que la population stable SKOV-3 MUC16-CTD expriment, quoiqu'en faible quantité, la protéine de fusion MUC16-CTD contenant les domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125. De plus, on constate que les deux étiquettes sont fonctionnelles en conditions natives et dénaturantes. La production de cette protéine est

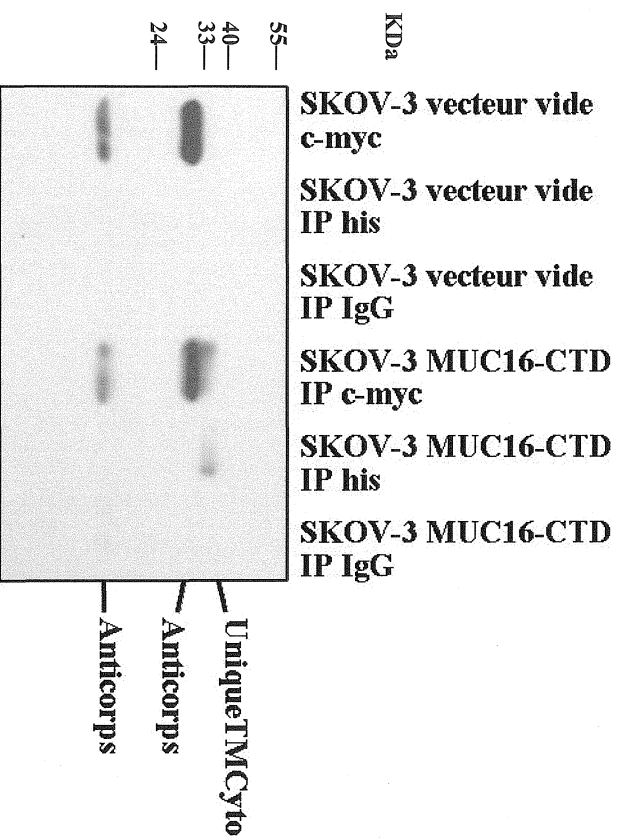
**Figure 21 : Validation de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD.**

(A) Une réaction de RT-PCR a été effectuée avec des extractions d'ARN des populations stables SKOV-3 vecteur vide et SKOV-3 MUC16-CTD et la séquence de MUC16-CTD a été amplifiée (contrôle positif : vecteur pME18S-FL3). Les produits de PCR ont été migrés sur gel d'agarose 1%. (B) Les immunoprécipitations contre les étiquettes c-myc et polyhistidine de la protéine MUC16-CTD faites avec des lysats de SKOV-3 vecteur vide et SKOV-3 MUC16-CTD. Des immunoprécipitations contrôles ont été faites avec des IgG normales de souris. Les immunoprécipitations ont été migrées sur gel SDS-PAGE 12% puis analysées par immunobuvardage de type western avec l'anticorps anti-c-myc.

A)



B)





due à la construction MUC16-CTD puisque la population stable faite avec le vecteur vide n'exprime pas de quantité détectable de la protéine MUC16-CTD.

### 30. Étude de gain de fonction de CA125 : sensibilité au cisplatine et au taxol de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD

La population stable SKOV-3 MUC16-CTD offre beaucoup de possibilités, outre le TAP. En fait, puisque cette population de cellules exprime une région d'une protéine que la lignée parentale SKOV-3 n'exprime normalement pas, cette population stable peut être utilisée dans le cadre d'études de gain de fonction. L'objectif principal du présent projet étant de déterminer l'implication de CA125 dans la sensibilité des cellules de cancer de l'ovaire aux agents cytotoxiques, il s'est avéré intéressant à cette étape-ci de voir si l'ajout de fonction des domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125 dans la lignée de cancer de l'ovaire SKOV-3 avait un effet sur la sensibilité aux drogues de chimiothérapie. De base, les cellules SKOV-3 ne constitue pas une lignée très sensible au cisplatine et au taxol, leur sensibilité pourrait en fait être qualifiée de moyenne.

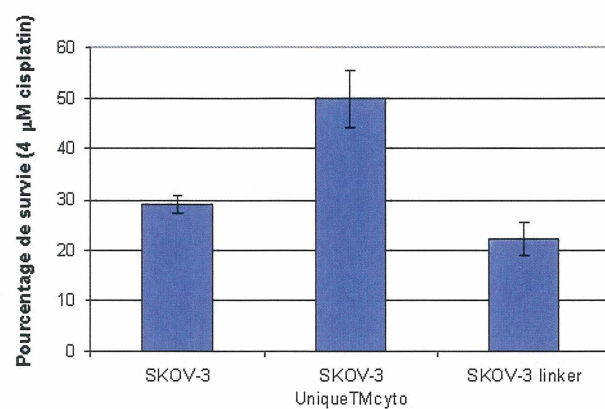
Des tests de sensibilité au cisplatine, drogue créant des dommages à l'ADN, et au taxol, drogue inhibitrice de la dynamique des microtubules, ont été faits. La sensibilité à ces drogues a été évaluée en mesurant la viabilité cellulaire à l'aide du XTT, comme pour les cellules CA125-knockdown de la lignée OVCAR-3. Dans chaque puits d'une plaque 96

puits, 10 000 cellules ont été ensemencées. Le lendemain, une fois les cellules adhérentes, les drogues ont été ajoutées en concentration croissante et, quatre jours plus tard, la mesure de la viabilité cellulaire par XTT a été faite. La figure 22 montre les deux histogrammes représentant le pourcentage de survie des cellules à une dose de cisplatine et de taxol s'approchant de l'IC<sub>50</sub> des cellules. Le test de sensibilité au cisplatine a été fait en triplicata tandis que le test du taxol a été fait en duplicata. On constate que l'ajout de fonction des domaines CTD de CA125 dans les SKOV-3 rend les cellules plus résistantes au cisplatine par rapport aux contrôles SKOV-3 vecteur vide et à la lignée parentale SKOV-3. L'acquisition par les cellules d'une plus grande résistance au cisplatine est d'autant plus significative que la lignée SKOV-3 n'est pas une lignée très sensible à cette drogue. Pour ce qui est de la sensibilité au taxol, aucune différence significative de sensibilité à cette drogue n'a été détectée à une dose près de l'IC<sub>50</sub>. Donc, comme pour les essais avec les cellules CA125-knockdown, la présence de CA125 rend les cellules moins sensibles aux agents génotoxiques, dans ce cas-ci au cisplatine, et n'a aucun impact sur la sensibilité aux drogues inhibant la dynamique des microtubules. De plus, ces essais permettent d'affirmer que les domaines de CA125 de la construction MUC16-CTD, c'est-à-dire les domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique, sont suffisants pour rendre les cellules plus résistantes au cisplatine et suggèrent que, lors de l'induction de l'apoptose par des drogues dommageables à l'ADN, MUC16-CTD a une fonction anti-apoptotique qui ne nécessite pas le domaine extracellulaire de CA125.

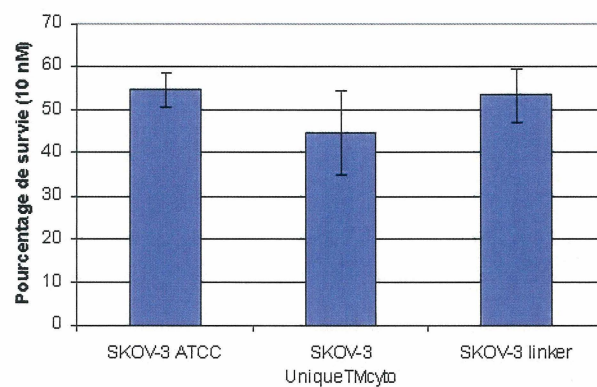
**Figure 22 : Essais de sensibilité de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD au taxol et au cisplatine.**

Des cellules des populations stables SKOV-3 vecteur vide, SKOV-3 MUC16-CTD ainsi que la lignée parentale SKOV-3 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits, à raison de 10 000 cellules par puits. Après 24 heures, différentes concentrations de drogues ont été ajoutées aux cellules puis la mesure de la viabilité cellulaire à l'aide du XTT a été faite 96 heures plus tard. Les résultats ont été mis sous forme d'histogrammes représentant le pourcentage de survie des cellules à une concentration de drogue près de l'IC50. En (A) : cisplatine. En (B) : taxol.

**A)** Sensibilité au cisplatine des cellules SKOV-3, SKOV-3 vecteur vide et SKOV-3 MUC16-CTD



**B)** Sensibilité au taxol des cellules SKOV-3, SKOV-3 vecteur vide et SKOV-3 MUC16-CTD



### 31. Mise au point des conditions d'immunoprécipitation de CA125 endogène

Afin de connaître les voies de signalisation dans lesquelles CA125 pourrait être impliqué, l'identification de partenaires d'interaction de CA125 a été tentée. La connaissance des protéines interagissant avec CA125 permettrait de fournir des pistes afin d'expliquer certains phénotypes observés chez les cellules CA125-knockdown et la population stable MUC16-CTD. La première méthode utilisée dans le but de déterminer des partenaires d'interaction de CA125 est l'immunoprécipitation de CA125 endogène à partir de la lignée de cancer de l'ovaire OVCAR-3 qui surexprime CA125. La mise au point des conditions d'immunoprécipitation a été faite en utilisant différentes quantités d'anticorps et de protéines totales provenant de lysat de OVCAR-3. Différents anticorps contre CA125 ont été testés, soit VK-8, M11 ou une combinaison des deux. Ces anticorps reconnaissent chacun un épitope différent situé dans le domaine de répétitions en tandem de CA125 (LLOYD et al, 1997; NUSTAD et al, 1996). Les immunoprécipitations ont été migrées sur gel SDS-PAGE et les protéines ont été colorées au Sypro Ruby, réactif permettant de visualiser les protéines sous lumière ultraviolette. La figure 23 montre les immunoprécipitations réalisées, où les bandes situées à 55 kDa et 23 kDa représentent respectivement les chaînes lourdes et légères des anticorps utilisées pour les immunoprécipitations. Dans toutes les pistes, y compris celles contenant les immunoprécipitations avec les anticorps VK-8 ou M11, la présence de CA125 n'est pas détectable. Il est répertorié que la plupart des protéine très glycosylée, telle que CA125, ne peuvent être détectées à l'aide des colorants d'usage courant (bleu de Coomassie, coloration

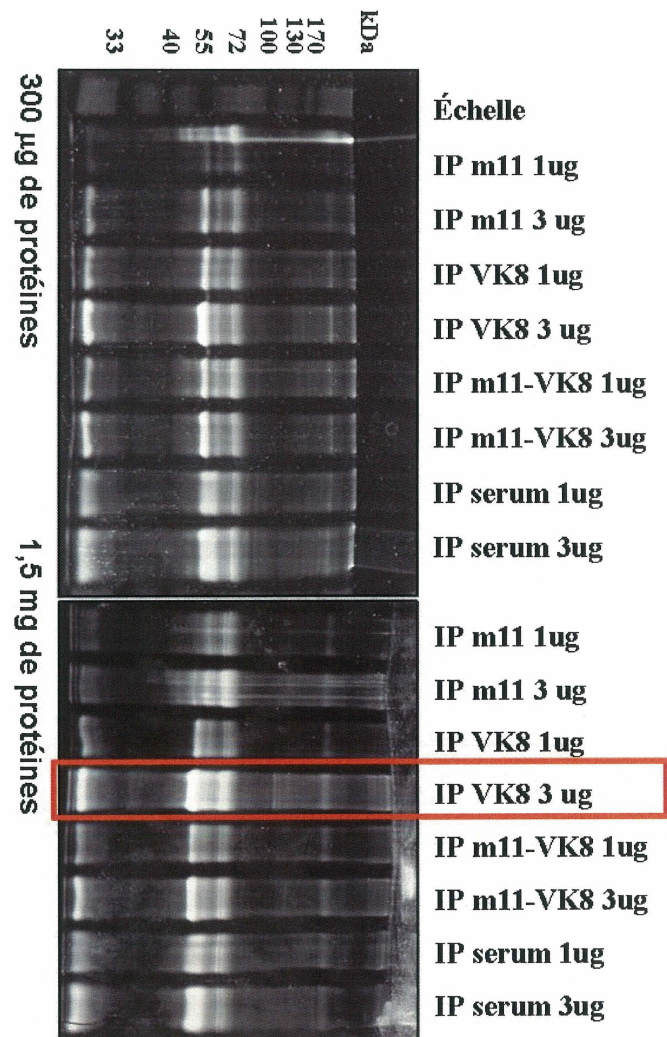
au nitrate d'argent et Sypro Ruby) (CARLSSON, 1993). Il est donc normal de ne pas constater la présence de CA125 avec le Sypro Ruby. Les conditions d'immunoprécipitation optimales recherchées permettraient d'obtenir des bandes se retrouvant exclusivement dans les pistes des immunoprécipitations de CA125 et n'étant pas détectées dans les pistes contrôles. Quoique les différentes combinaisons des conditions choisies ne permettent pas de façon évidente l'obtention de conditions idéales, l'immunoprécipitation réalisée avec 1.5 mg de protéines et 3 µg d'anticorps VK-8 semble meilleure que les autres et a été sélectionnée. Plusieurs bandes sont présentes exclusivement dans cette piste, dont les trois bandes à environ 32 kDa, 72 kDa et 100 kDa.

### 31.1 Analyse par spectrométrie de masse de l'immunoprécipitation de CA125 endogène

Une immunoprécipitation de CA125 a été faite à l'aide des conditions d'immunoprécipitation sélectionnée selon l'expérience de mise au point des conditions optimales d'immunoprécipitation de CA125 endogène. Avant l'analyse par spectrométrie de masse, une confirmation de la validité de l'immunoprécipitation a été faite en vérifiant la présence de CA125 par immunobuvardage de type western. La figure 24 montre qu'un signal typique de CA125 est observé dans la piste contenant 10% de la totalité de l'immunoprécipitation. La détection de CA125 par immunobuvardage de type western résulte toujours en un signal dispersé variant entre 70 kDa à 300 kDa (LLOYD et YIN, 2001; SEELENMEYER et al, 2003; FENDRICK et al, 1997). La présence de cette trainée

**Figure 23 : Mise au point des conditions d'immunoprécipitation de CA125 endogène.**

Les immunoprécipitations de CA125 endogène ont été effectuées avec 1.5 mg ou 300 µg de protéines provenant de lysats frais de cellules OVCAR-3 et 1 µg ou 3 µg d'anticorps VK-8 ou M11, ou une combinaison des deux. Des immunoprécipitations contrôles ont été faites avec des anticorps non-spécifiques contenus dans du sérum normal de souris. Les immunoprécipitations ont été migrées sur gel SDS-PAGE 10% et colorées au Sypro Ruby. L'immunoprécipitation dont les conditions sont les meilleures a été encadrée.



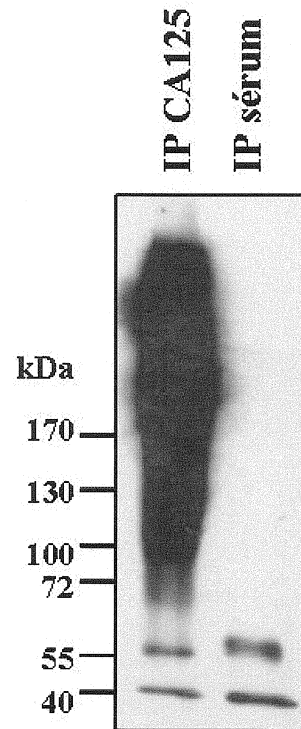


caractéristique de CA125 peut être due à son très haut poids moléculaire et à sa forte glycosylation, rendant ainsi sa migration sur gel difficile. De même, la possible existence d'isoformes de CA125 pourrait ajouter à la variabilité du poids moléculaire de cette protéine. Le contrôle consistant en une immunoprécipitation avec des anticorps contenus dans un sérum normal de souris ne permet pas de détection de la protéine CA125, ce qui indique que l'immunoprécipitation de CA125 avec l'anticorps VK-8 est spécifique. Les deux bandes apparaissant dans la piste de l'immunoprécipitation contrôle sont les chaînes lourdes et légères des anticorps présents dans le sérum de souris utilisé.

Afin d'identifier les protéines récoltées lors de l'immunoprécipitation de CA125, cette dernière a été envoyée au laboratoire de spectrométrie de masse du Dr Guy Poirier situé au Centre de Recherche Clinique du CHUL, à Québec. Les protéines identifiées sont listées au tableau 5. Seules les protéines ayant une probabilité supérieure à 0.9 ont été conservées. Cette probabilité dépend entre autres du nombre de peptides identifiés dans une même protéine et du pourcentage de couverture de la séquence totale de la protéine identifiée.

**Figure 24 : Validation de l'immunoprécipitation de CA125 endogène.**

Un immunobuvardage de type western a été fait afin de confirmer la présence de CA125 dans l'immunoprécipitation réalisée pour l'analyse en spectrométrie de masse. 10% du volume final de l'immunoprécipitation contre CA125 et de l'immunoprécipitation contrôle a été migré sur gel SDS-PAGE 7.5%. L'hybridation a été effectuée avec l'anticorps M11.



**Tableau 5 : Identification par spectrométrie de masse des protéines présentes dans les complexes immunoprécipités.**

Immunoprécipitation avec l'anticorps VK-8 dirigé contre CA125 dans un lysat de la lignée cellulaire de cancer de l'ovaire OVCAR-3.

Probabilité	Pourcentage de couverture	Nombre de peptides	Description de la protéine
1.00	3.3	3	<b>Mucine 16; CA125 marqueur tumoral relié au cancer de l'ovaire</b>
1.00	3.7	2	Kératine 1
1.00	2.9	2	Kératine 9
1.00	11.7	5	Ig gamma-1, région de la chaîne C, forme liée à la membrane
1.00	2.7	5	Précurseur de la low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 1
1.00	5.8	2	Précurseur de la sérotransferrine (Beta-1-metal binding globulin)
1.00	13.9	5	Précurseur de la trypsine
0.99	2.2	1	Kératine 10
0.99	4.4	1	Transmembrane 9 superfamily protein member 3
0.99	14.7	1	Rab-1B (Ras-related protein), Isoforme d'épissage 3 de Rab-1A (Ras-related protein)
0.98	1.8	1	Précurseur de l'albumine du sérum
0.96	9.7	1	Ig kappa, région 26-10 de la chaîne V-II
0.93	12.3	1	Ig kappa, région de la chaîne C
0.91	2.1	1	Heat shock 70 kDa protein 9B, Stress-70 protein
0.91	11.6	1	Ig kappa, région MIL de la chaîne V-II

L'identification de CA125 (en gras dans le tableau) fait office de contrôle positif et confirme que l'immunoprécipitation a fonctionné. Les protéines inhérentes à ce type d'expérience, par exemple les anticorps et la trypsine, ont été laissées en noir dans le tableau et ne doivent pas être considérées comme des partenaires d'interactions potentiels de CA125. Les protéines dont la description est en rouge dans le tableau sont des partenaires potentiels d'interaction directe ou indirecte de CA125. Parmi ces protéines, notons la présence de

HSP-70 qui est impliqué dans le transport à la mitochondrie de la queue cytoplasmique de MUC1 (REN et al, 2005).

### 32. Essai préliminaire de purification de la protéine de fusion MUC16-TMcyto par colonne de nickel

Après avoir confirmé que l'expression transitoire des constructions MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD dans la lignée cellulaire COS-7 était possible, un essai préliminaire de purification par colonne de nickel a été effectué. Ce type de purification consiste en fait en la première étape de la version du TAP qui a été établit dans le laboratoire (voir figure 17A). La construction contenant les domaines TMcyto a été choisie pour cet essai étant donné qu'elle a été la première construction obtenue et validée en transfection transitoire.

Des cellules COS-7 ont été transfectées transitoirement avec MUC16-TMcyto ou avec le vecteur vide pSTCF cyto linker. Pour chacun des deux vecteurs, trois pétris de 10 cm contenant chacun 3 000 000 de cellules ont été transfectés avec 5.3 µg d'ADN à l'aide d'un agent de transfection lipidique. Les cellules ont été lysées 72 heures plus tard et la purification par colonne de nickel a été effectuée. La figure 25A montre le graphique de l'évolution de la purification par colonne de nickel. Ce graphique indique tout d'abord que la plupart des protéines passées dans la colonne ne sont pas restées liées à celle-ci et se

retrouvent dans les fractions F (de flow-through), comme le démontre la grande absorbance de ces fractions. Ensuite, les lavages (L) ont permis aux protéines non-spécifiques, qui n'étaient pas liées à la colonne, d'être retirées de cette dernière. Finalement, lorsque l'absorbance des fractions de lavage est devenue très faible, indiquant que la majorité des protéines non-spécifiques ont été évacuées de la colonne par les lavages, l'élution compétitive a été effectuée en augmentant la concentration d'imidazole dans le tampon. La protéine d'intérêt semble majoritairement être éluée de la colonne à la fraction d'élution E3.

Le graphique de l'absorbance des protéines en fonction des fractions ne fait qu'indiquer la présence de protéines, sans toutefois pouvoir confirmer s'il s'agit ou non de la protéine d'intérêt. Pour pallier à cette lacune, les fractions de flow-through, de lavage et d'élution ont été analysées par immunobuvardage de type western afin de s'assurer que la protéine MUC16-TMcyto lie la colonne de nickel et est éluée lors de l'augmentation de la concentration d'imidazole. La figure 25B montre l'immunobuvardage de type western hybridé avec l'anticorps contre c-myc. Premièrement, on peut voir que deux bandes sont présentes dans le lysat : une vers 20 kDa et une vers 35 kDa. La bande à 20 kDa avait déjà été observée lors de l'analyse par immunobuvardage de type western des COS-7 transfectées transitoirement avec MUC16-TMcyto. Par contre, aucune seconde bande n'avait été détectée lors de cette expérience. Puisque ces deux bandes ont une différence de poids équivalent à un facteur 2, l'hypothèse la plus probable pour expliquer la présence de ces deux bandes est que le tampon de chargement des échantillons ne contenait pas assez d'agents dénaturants et a ainsi permis la création de dimères de la protéine de fusion qui ont co-migrés dans le gel. On peut aussi voir sur l'immunobuvardage de type western que très

peu de la protéine MUC16-TMcyto est relâchée de la colonne de nickel dans les fractions F et de lavage, indiquant que la protéine d'intérêt lie la colonne de nickel et que les conditions de lavage permettent à cette protéine de rester fixée à la matrice de nickel. Ensuite, les fractions d'élution montre que la protéine MUC16-TMcyto est éluée de la colonne, majoritairement à la fraction E3, ce qui corrèle avec les observations faites à l'aide du graphique de l'évolution de la purification. Les conditions d'élution sont donc assez fortes pour permettre la sortie de la protéine. L'immunobuvardage de type western des fractions de la purification faite avec les cellules transfectées avec le vecteur vide (non-montré) n'a démontré aucune bande spécifique à l'étiquette c-myc. Donc, cette expérience démontre que la protéine MUC16-TMcyto peut être purifiée par une colonne de nickel à l'aide de son étiquette polyhistidine et qu'il n'y a que très peu, sinon pas du tout, de perte de la protéine d'intérêt lors des étapes précédant l'élution.

Pour vérifier la pureté de la protéine MUC16-TMcyto éluée, un gel SDS-PAGE a été effectué avec les différentes fractions de la colonne et a été coloré au nitrate d'argent, tel que montré à la figure 25C. Beaucoup de protéines non-spécifiques ont été relâchées de la colonne avec les fractions de F et de lavage. On peut aussi constater que les lavages ont été suffisants à enlever de la colonne toutes les protéines non-liées à la matrice de nickel puisque très peu de protéines sont présentes dans la piste de la dernière fraction de lavage L6. Finalement, on retrouve un signal de haut poids moléculaire dans toutes les pistes d'élution. Cette protéine non-identifiée n'est pas MUC16-TMcyto puisque le poids moléculaire de cette dernière est beaucoup plus bas que ce signal et que l'immunobuvardage de type western anti-c-myc n'a pas détecté ces bandes. La bande MUC16-TMcyto elle-

même n'est pas détectable, probablement parce que les fractions d'élution sont trop diluées. Cette expérience permet de conclure que l'utilisation de la colonne de nickel a permis l'obtention de la protéine MUC16-TMcyto d'une pureté de qualité moyenne. Une augmentation de la stringence des conditions de lavage permettrait d'améliorer la pureté du produit MUC16-TMcyto obtenu en éliminant le contaminant de haut poids moléculaire détecté sur gel. Après optimisation du protocole, cette technique pourra être utilisée afin d'identifier des partenaires d'interaction des domaines de CA125 par le TAP.



**Figure 25 : Purification de la protéine de fusion MUC16-TMcyto par colonne de nickel.**

Des cellules COS-7 ont été transfectées transitoirement avec MUC16-TMcyto et avec le vecteur vide pSTCF cyto linker puis lysées 72 heures plus tard. En (A), l'absorbance à 595 nm des fractions a été mesurée avec le réactif de Bradford puis mise en graphique en fonction des fractions chronologiques. En (B), les fractions ont été mises sur gel SDS-PAGE 15% afin d'effectuer un immunobuvardage de type western contre l'étiquette c-myc de la protéine de fusion MUC16-TMcyto. En (C), les protéines des fractions ont été migrées sur gel SDS-PAGE, puis colorées au nitrate d'argent. En (B) et (C), un maximum de protéines a été déposé sur gel, soit environ 24 µg pour les fractions F, 12 µg pour les fractions L et 3 µg pour les fractions E. E : Élution, F : Flow-through, L : Lavage.



## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

### 33. Validation des constructions du TAP et de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD

L'étude des fonctions de CA125 s'est avérée difficile en raison de la forte taille de cette protéine, comme la plupart des mucines d'ailleurs. Il était donc essentiel de développer des outils d'études de CA125 de manière à contourner ce problème. Les clones CA125-knockdown produits dans le laboratoire et exprimant un scFv constituent une solution à cette difficulté, puisque la taille de la protéine étudiée n'est pas limitante dans ce contexte. L'étude des fonctions d'une protéine peut aussi s'effectuer par la technologie de l'interférence par ARN. Par contre, vu la taille de CA125, cette méthode ne s'est pas avérée concluante dans notre laboratoire. Une autre solution à ce problème est la génération de constructions d'ADN permettant l'expression de certains domaines de CA125 seulement, diminuant ainsi de beaucoup la taille de la protéine avec laquelle les expériences doivent être faites. De plus, l'utilisation de seulement quelques-uns des domaines de CA125, au lieu de la protéine dans sa totalité, offre la possibilité d'associer des fonctions à ces domaines en particulier.

L'établissement d'une population stable exprimant certains domaines de CA125 devenait indispensable à l'avancement des projets portant sur CA125 dans le laboratoire. Les clones stables dérivés de la lignée NIH :OVCA-3 et exprimant un scFv dirigé contre CA125

permettent de faire l'étude des rôles de CA125 par la perte de fonction de cette protéine. La création d'un outil, tel que la population stable SKOV-3 MUC16-CTD, permettant l'étude de CA125 par le gain de fonction de certains domaines de la protéine permettra de compléter les résultats obtenus jusqu'à ce jour dans le laboratoire. Des populations stables ont été générées au lieu de clones stables car la population stable est plus hétérogène, étant donné qu'elle est générée par plusieurs cellules transfectées avec un même ADN. Les phénotypes observés à l'aide d'une population stable représentent en fait la moyenne des phénotypes de chaque population clonale formant la population stable. Elle permet donc d'éviter l'obtention de résultats artéfactuels entraînés par l'élaboration de clones stables générés à partir d'une seule cellule. De plus, ces populations stables offrent de nombreuses autres possibilités. Premièrement, l'option de faire un TAP à l'aide de ces constructions permettra d'identifier des protéines interagissant avec CA125. Deuxièmement, il sera possible, à l'aide des différentes constructions, d'identifier le ou les domaine(s) de CA125 qui permet(tent) l'interaction ou la fonction identifiée. Finalement, les deux étiquettes peptidiques des protéines de fusion permettront de détecter la localisation et le déplacement, s'il y a lieu, des domaines de CA125 dans la cellule dans le cadre de différents contextes. Cette possibilité est d'autant plus importante qu'il n'existe pas d'anticorps dirigé contre les domaines unique, transmembranaire ou cytoplasmique de CA125.

Les différentes constructions destinées au TAP, c'est-à-dire MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD, ont été validées en systèmes cellulaires transitoire et stable. D'abord, les transfections transitoires de ces plasmides dans les cellules COS-7 ont permis de confirmer l'expression des protéines de fusion. L'immunoprécipitation des protéines

MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD avec les anticorps dirigés contre les étiquettes c-myc et polyhistidine ont permis de confirmer la fonctionnalité de ces deux étiquettes. De plus, l'essai préliminaire de purification de la protéine MUC16-TMcyto par colonne de nickel via l'étiquette polyhistidine a permis la purification de la protéine MUC16-TMcyto dans une pureté modérée. Le protocole de purification demeure à améliorer afin d'obtenir une meilleure pureté et un plus grand rendement de protéines purifiées. L'augmentation de la stringence du tampon de lavage permettra sans doute de diminuer le nombre et la concentration de protéines non-spécifiques récoltées lors de l'élution. Lorsque la mise au point de cette expérimentation sera complétée, un essai de TAP pourra être effectué, où la purification par colonne de nickel sera suivie par une purification par immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps contre l'étiquette c-myc.

Après la validation des constructions dans un système transitoire, les populations stables SKOV-3 MUC16-TMcyto et SKOV-3 vecteur vide ont été générées dans la lignée SKOV-3, qui est une lignée de cancer de l'ovaire CA125-négative. L'expression de l'ARNm des domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125 dans la population SKOV-3 MUC16-CTD a été confirmée par RT-PCR, ce qui a permis de certifier que ces domaines sont exprimés uniquement chez SKOV-3 MUC16-CTD, et non dans la population stable contrôle. Des expériences d'immunoprécipitation ont confirmé l'expression de la protéine MUC16-CTD dans les cellules SKOV-3 MUC16-CTD ainsi que la validité des deux étiquettes c-myc et polyhistidine. La quantité de protéine MUC16-CTD produite par la population stable MUC16-CTD semble être relativement faible. Toutefois, cette faible expression ne constitue pas un désavantage puisque, par opposition, une trop grande

expression de la protéine d'intérêt pourrait potentiellement entraîner la génération d'interactions protéiques artéfactuelles. Donc, grâce à ces expériences, les constructions MUC16-TMcyto, MUC16-Unique et MUC16-CTD et la population stable SKOV-3 MUC16-CTD ont été validées et pourront être utilisées dans l'avancement de notre connaissance de CA125 et de ses fonctions.

#### 34. CA125 et la sensibilité aux agents génotoxiques

Le cancer épithélial de l'ovaire est un cancer ayant un haut taux de mortalité. Outre le fait que les premiers stades de la maladie sont asymptomatiques et qu'il y a un manque de méthodes diagnostiques assez sensibles et assez spécifiques pour détecter la maladie à un stade précoce, ce haut taux de mortalité peut aussi être attribué à l'émergence d'une résistance aux traitements anti-cancéreux (SCHUMMER et al, 1999; MARTIN, 2002; WHITEHOUSE et al, 2003). Chez les patientes ayant subi une récurrence et nécessitant un second traitement de chimiothérapie, la majorité décèdent, dû au développement d'une résistance aux agents de chimiothérapie (AGARWAL et KAYE, 2003). En fait, les statistiques évoquées ces dernières années indiquent que les chances de survie d'une patiente atteinte d'un cancer de l'ovaire de stade avancé est de 20% et ce, cinq ans après son diagnostic (GUSTAVO et KALIL, 2002). Par contre, certaines investigations récentes non-publiées suggèrent que ce pourcentage de survie approcherait le 0% lorsque ce type d'étude est fait dix ans après le diagnostic initial. Cette étude découle en fait de la

capacité des cellules cancéreuses à acquérir des moyens de contournement de l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques. Ces évidences démontrent à quel point le traitement du cancer de l'ovaire n'est pas optimal et qu'il y a un manque d'outil permettant de cibler un traitement plus adéquat, et peut-être plus personnalisé, pour les patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire. Dans cette optique, la détermination de l'implication de CA125, principal marqueur clinique du cancer ovarien, dans la réponse des cellules de cancer de l'ovaire aux agents de chimiothérapie devient d'autant plus pertinente.

L'étude de l'implication de CA125 dans la sensibilité des cellules de cancer de l'ovaire aux agents chimiothérapeutiques a tout d'abord été réalisée à l'aide des clones stables CA125-knockdown dérivés de la lignée humaine de cancer de l'ovaire NIH :OVCAR-3. La sensibilité de ces clones à différentes drogues de chimiothérapie a été mesurée par un test de viabilité cellulaire à l'aide du XTT, qui consiste en une évaluation indirecte de la survie cellulaire par mesure de l'activité métabolique des cellules. Ces expériences ont permis de constater qu'à une dose près de l'IC<sub>50</sub>, les clones CA125-knockdown sont plus sensibles aux agents génotoxiques cisplatine, cyclophosphamide, doxorubicine et vinorelbine que les cellules contrôles. Par contre, aucune différence de sensibilité n'a été observée pour ce qui est des drogues affectant la dynamique des microtubules, c'est-à-dire le taxol et la vinorelbine. Donc, CA125 semble être impliqué spécifiquement dans la modulation de la sensibilité des cellules de cancer de l'ovaire aux agents génotoxiques, c'est-à-dire les drogues qui créent des dommages à l'ADN. Cette affirmation est appuyée par l'étude de gain de fonction faite avec la population stable SKOV-3 MUC16-CTD exprimant les domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125. À une dose près de

l'IC<sub>50</sub>, la population stable SKOV-3 MUC16-CTD est plus résistante au cisplatine, une drogue génotoxique, que les cellules contrôles de la lignée parentale SKOV-3 et de la population stable SKOV-3 vecteur vide. En considérant que la lignée SKOV-3 possède déjà une certaine résistance de base aux drogues de chimiothérapie, cette augmentation de la résistance au cisplatine lors de l'expression forcée de MUC16-CTD dans ces cellules confirme d'autant plus l'importance de l'implication de CA125 et de son domaine C-terminal dans la modulation de la sensibilité aux agents génotoxiques. De plus, lors d'un traitement au taxol, la population stable SKOV-3 MUC16-CTD ne montre pas de différence de sensibilité à cette drogue par rapport aux cellules contrôle. Ceci appuie donc l'hypothèse émise ultérieurement selon laquelle CA125 est impliqué dans une spécificité de sensibilité aux agents dommageant l'ADN. De plus, cette étude de gain de fonction permet d'affirmer que le domaine C-terminal de CA125, formé des domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique, est suffisant afin de remplir le rôle protecteur de CA125 contre l'apoptose induite par les agents génotoxiques.

L'analyse par cytométrie de flux de l'expression de surface de CA125 a démontré que celle-ci n'est pas affectée par le traitement des cellules avec des agents de chimiothérapie tel que le cisplatine. De plus, la différence de sensibilité aux agents génotoxiques n'est pas due à une différence des niveaux d'expression endogènes des molécules de la cascade apoptotique Bax, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, XIAP, pro-caspase-3 et pro-caspase-9 puisque les niveaux d'expression de ces molécules sont similaires chez les cellules CA125-knockdown et les cellules contrôles. Puisqu'une stabilité du niveau d'expression de la caspase-3 dans les divers clones et dans la lignée parentale suggère fortement mais ne confirme pas nécessairement une



stabilité des niveaux d'activité de celle-ci, la mesure de l'activité basale de la caspase-3 de ces cellules a été faite. Cette expérience a permis d'affirmer que la sensibilité accrue des cellules CA125-knockdown aux agents génotoxiques n'est pas due à une différence au niveau de l'activité basale de la caspase-3.

Le traitement de cellules cancéreuses avec des agents de chimiothérapie amène les cellules à mourir par voie apoptotique, et non par nécrose (BOULIKAS et VOUGIOUKA; 2003; SIDDIK, 2003). Cette dernière, contrairement à l'apoptose, crée une zone nécrotique faisant mourir les cellules saines au pourtour de cet endroit. De plus, la nécrose amène une réponse inflammatoire générale qui n'est pas favorable à la patiente subissant un traitement de chimiothérapie (EDINGER et THOMPSON, 2004). Dans le cas présent, un traitement de quatre jours des clones stables CA125-knockdown avec le cisplatine a permis de constater que le clivage de la caspase-9 et de la caspase-3 y est plus précoce, démontrant que les cellules meurent bel et bien par apoptose. L'activité de la caspase-3 a aussi été mesurée puisque la disparition de la bande de pro-caspase-3, quoique suggérant fortement son activation, pourrait quand même ne pas corrélérer avec son activité (SHI, 2002). La mesure de l'activité de la caspase-3 lors d'un traitement au cisplatine a montré une activité plus importante de cette caspase chez les clones CA125-knockdown par rapport aux cellules contrôles. Donc, l'activité de la caspase-3 corrèle avec l'expérience d'évaluation du clivage de la pro-caspase-3 et confirme encore une fois que les cellules traitées au cisplatine meurent par apoptose. Cette différence d'activité de la caspase-3, quoiqu'elle ne soit pas très grande, est biologiquement significative. En effet, lors d'un traitement au cisplatine, les clones CA125-knockdown montrent un clivage plus précoce de PARP, qui est un substrat naturel

de la caspase-3, comparativement aux cellules contrôles. Le clivage plus précoce de la caspase-9 et de la caspase-3, de même que l'augmentation de l'activité de la caspase-3 et le clivage plus précoce de PARP dans les cellules CA125-knockdown confirment donc qu'il y a induction de l'apoptose par le cisplatine. L'avènement plus précoce de l'apoptose dans les clones CA125-knockdown corréle avec le fait que ces cellules soient plus sensibles aux agents génotoxiques par rapport aux cellules contrôles. De plus, le fait qu'il y ait activation de la caspase-9 suggère que l'apoptose induite par le cisplatine passe par la voie mitochondriale. Par contre, on ne peut exclure la possibilité que la voie des récepteurs de mort cellulaire ou que des molécules en amont de la caspase-9 soient impliquées dans l'induction de cette apoptose. En effet, bien que la voie mitochondriale demeure la voie apoptotique induite par le cisplatine la plus documentée, la voie des récepteurs de mort cellulaire peut aussi être activée (BOULIKAS et VOUGIOUKA; 2003; SIDDIK, 2003). Dans le cas présent, il serait possible que la voie des récepteurs de mort cellulaire soit la première voie activée lors d'un traitement au cisplatine et qu'il y ait par la suite un transfert vers la voie mitochondriale. Dans ce cas, la caspase-8 permettrait l'activation de l'homologue Bid en le clivant afin qu'il devienne l'homologue actif t-Bid. Alors, t-Bid enclencherait la voie mitochondriale par l'inhibition des homologues anti-apoptotiques Bcl-2, ce qui permettrait aux homologues pro-apoptotiques de la sous-famille Bax de faire une brèche dans la mitochondrie et de permettre la relâche du cytochrome c. Par la suite, la formation de l'apoptosome permettrait l'activation de la caspase-9. L'hypothèse de l'implication de CA125 dans la modulation de la voie des récepteurs de mort cellulaire est secondée par le fait que, dans le laboratoire, les clones CA125-knockdown démontrent une

plus grande sensibilité au FasL et à TRAIL, deux ligands des récepteurs de mort cellulaire activant la voie extrinsèque de l'apoptose (données non-publiées).

Tout comme CA125, MUC1 confère aux cellules une plus grande résistance aux agents génotoxiques. Le groupe de Kufe a démontré que MUC1 atténue la voie apoptotique mitochondriale lors du traitement de cellules de carcinome de colon avec le cisplatine ou l'étoposide, deux drogues génotoxiques. Lors d'un traitement au cisplatine, la présence de MUC1 est associée à une atténuation de la relâche du cytochrome c et de AIF, de même qu'à une diminution de l'activation de la caspase-3. La résistance aux agents génotoxiques conférée par MUC1 serait due à la translocation de sa queue cytoplasmique à la mitochondrie (REN et al, 2004). Un complexe protéique impliquant les chaperonnes HSP-70 et HSP-90 est responsable du transport de la queue cytoplasmique de MUC1 jusqu'à la mitochondrie. La queue cytoplasmique est par la suite intégrée dans la membrane externe de cette organelle. Le mécanisme par lequel la queue cytoplasmique de MUC1 protège de l'apoptose intrinsèque reste toutefois à établir (REN et al, 2005). Par analogie avec MUC1, il est possible que la queue cytoplasmique de CA125 transloque elle aussi à la mitochondrie et protège la cellule contre l'apoptose induite par les agents génotoxiques en empêchant l'activation de la voie intrinsèque. Lors de l'expérience d'immunoprécipitation de CA125 endogène, la protéine HSP-70 a été co-immunoprécipitée et identifiée par spectrométrie de masse. Cette interaction de HSP-70 avec CA125 permet de suggérer que, comme dans le cas de MUC1, la queue cytoplasmique de CA125 pourrait transloquer à la mitochondrie à l'aide de cette chaperonne et remplir ses fonctions protectrices contre l'apoptose induite par les agents génotoxiques. La présence du C-terminal de CA125 à la mitochondrie n'a par

contre pas encore été vérifiée. Toutefois, cette hypothèse est soutenue par certains résultats obtenus dans le laboratoire par double-hybride dans la levure. Une interaction a été démontré par cette technique entre la queue cytoplasmique de CA125 et une protéine composant la sous-unité F0/F1 de l'ATP synthase (données non-publiées). L'ATP synthase est une pompe à protons située dans le membrane interne de la mitochondrie. La sous-unité F0/F1 de l'ATP synthase étant une protéine mitochondriale, son interaction avec la queue cytoplasmique de CA125 suggère que CA125 peut être localisé à la mitochondrie. De plus, la fonction de cette protéine mitochondriale est indirectement modulée par certains homologues Bcl-2 et est essentielle à l'apoptose par voie mitochondriale, donnant ainsi une autre évidence de la possible implication de CA125 dans le processus apoptotique (GREEN et REED, 1998).

Du côté de la survie cellulaire, les résultats concernant les niveaux plus importants de P-AKT dans les cellules CA125-knockdown par rapport aux cellules contrôles ont tout d'abord parus étonnants. Il est connu que la voie PI3K/AKT stimule la prolifération, la croissance et la motilité cellulaires, l'angiogénèse et le métabolisme du glucose. Donc, dans la majorité des cas, P-AKT est associé à une survie favorable, et non à la mort cellulaire (SEN et al, 2003). L'obtention de niveaux plus important de P-AKT dans les cellules CA125-knockdown, qui sont plus sensibles aux agents génotoxiques, peut donc sembler contraire à la logique. Par contre, dans certains cas répertoriés dans la littérature, P-AKT remplit une fonction pro-apoptotique et ne promouvoit alors pas la survie cellulaire. Par exemple, dans des cellules surexprimant la cavéoline-1, la suractivation de AKT sensibilise les cellules à l'apoptose induite par les arsénites ou le peroxyde. L'introduction d'un

dominant négatif de AKT dans ces cellules améliore la survie des cellules traitées avec ces agents (SHACK et al, 2003). D'ailleurs, selon des études de biopuces à ADN obtenues dans le laboratoire, les cavéolines 1 et 2 sont surexprimées d'un facteur entre 9 et 27 fois chez le clone CA125-knockdown 1 :9 #9 par rapport au clone scFv contrôle et à la lignée parentale OVCAR-3 (données non-publiées). Cette surexpression des cavéolines pourrait permettre à AKT, déjà suractivé dans les clones CA125-knockdown, de remplir une fonction pro-apoptotique et de sensibiliser les cellules aux agents génotoxiques. De plus, les résultats concernant les hauts niveaux de P-AKT dans les cellules CA125-knockdown corrélerent avec d'autres résultats obtenus par ces expériences de biopuces à ADN. Une augmentation de l'expression de EGFR a été constatée chez le clone CA125-knockdown 1 :9 #9 par rapport aux cellules contrôles (données non-publiées). La phosphorylation de AKT étant stimulée par l'activation de récepteurs de facteurs de croissance, une plus grande expression de EGFR entraînera donc une plus grande phosphorylation de AKT dans le cas où les cellules sont traitées à l'EGF. Puisque les cellules CA125-knockdown et les cellules contrôles sont maintenues en culture dans un milieu complet contenant des facteurs de croissance, la stimulation par l'EGF combinée à l'augmentation de EGFR chez les clones CA125-knockdown permettrait de plus haut taux de P-AKT par rapport aux cellules contrôles OVCAR-3 et scFv contrôle.

L'augmentation des niveaux endogènes de P-AKT dans les clones CA125-knockdown par rapport aux cellules contrôles suggèrent que ce n'est pas un désavantage de survie qui est la cause de la plus grande sensibilisation de ces clones aux agents génotoxiques. Toutefois, il ne faut pas oublier que seule la voie de survie de PI3K/AKT a été regardée et que, quoique

cette dernière soit centrale à la survie cellulaire, elle est tout de même contrôlée par une multitudes d'autres voies de signalisation. Ces voies, qui n'ont pas encore été sondées, pourraient être modulées chez les clones CA125-knockdown et ainsi entraîner un débalancement de l'équilibre de survie, expliquant la plus grande sensibilité des cellules aux agents génotoxiques. La vérification de l'implication de P-AKT dans la sensibilité accrue des cellules CA125-knockdown au cisplatine pourrait être possible en bloquant la voie PI3K/AKT à l'aide d'un inhibiteur spécifique et en observant si cette inhibition rétablirait la sensibilité de ces cellules.

Dans le cas de MUC1, une diminution de l'activation de la voie PI3K/AKT, et donc de la phosphorylation de AKT, est entraînée par l'introduction de l'expression de la portion C-terminale de MUC1 dans des cellules de carcinome de colon. Cette observation est d'ailleurs similaire à ce qui a été observé dans le cas des cellules CA125-knockdown où la diminution de l'expression de surface de CA125 entraîne une augmentation de la phosphorylation de AKT. Dans l'exemple mentionné, la diminution des niveaux de P-AKT dans les cellules MUC1-positives amène une hypophosphorylation de FOXO3a et une augmentation de l'activation de ce dernier. Donc, par l'activation de FOXO3a via P-AKT, MUC1 régule les niveaux intracellulaires d'oxydants et la réponse apoptotique aux stress oxydatifs en atténuant les niveaux de ROS dans la cellule (YIN et al, 2003; YIN et al, 2004). Lorsque activé, FOXO3a transloque au noyau et remplit ses fonctions de transcription de gènes de protéines impliquées dans la réponse à certains stress cellulaires et dans la réparation de l'ADN (KOPS et BURGERING, 1999, SKURK et al, 2004). Dans cette optique, les niveaux d'expression endogènes et la localisation cellulaire de FOXO3a ont été

vérifiés chez les clones stables CA125-knockdown par rapport aux cellules contrôles. Il a d'abord été constaté que l'expression basale de FOXO3a est fortement diminuée dans les clones CA125-knockdown en comparaison avec les cellules contrôles. L'expression de FOXO3a ne semble toutefois pas être modulée par le traitement des cellules au cisplatine. La diminution de l'expression de FOXO3a chez les cellules CA125-knockdown indique que ce facteur de transcription semble être impliqué dans une ou des voies communes avec CA125. La réduction de l'expression de base de FOXO3a pourrait être due à la modulation par CA125 de la transcription de cette protéine. Cette activité de régulateur de la transcription de CA125 n'est pas répertoriée mais demeure possible puisque CA125 a un motif KRRR représentant une séquence typique de NLS. De plus, la queue cytoplasmique de la mucine MUC1 transloque non seulement à la mitochondrie, mais au noyau, où elle remplit une activité de co-activateur de la transcription lorsque couplée à la  $\beta$ -caténine (WEN et al, 2003; HUANG et al, 2005).

La localisation cellulaire de FOXO3a par immunofluorescence indirecte sur lame a démontré que ce facteur de transcription est localisé presque exclusivement au noyau chez les cellules contrôles OVCAR-3 et scFv contrôle. Par opposition, pour ce qui est des clones CA125-knockdown, la localisation de FOXO3a s'étend au cytoplasme et semble même être exclue du noyau chez le clone 1 :9 #9. La légère différence de localisation de FOXO3a entre les deux clones CA125-knockdown peut être attribuée au fait que ces clones sont indépendants l'un par rapport à l'autre. Ces clones démontrent des phénotypes similaires, mais non identiques, ce qui prouve leur indépendance et permet de corroborer les résultats obtenus. Les résultats concernant la localisation de FOXO3a corréleront avec l'observation de

plus grands niveaux d'expression de P-AKT chez les clones CA125-knockdown. En effet, de plus grands niveaux de P-AKT entraîne une phosphorylation plus importante de FOXO3a et donc une séquestration de ce dernier au cytoplasme par des protéines chaperonnes. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle, dans les clones CA125-knockdown, une translocation réduite de FOXO3a au noyau amènerait une diminution de la transcription des gènes cibles de ce facteur de transcription. En prenant en considération qu'une partie de ces gènes cibles sont des gènes codant pour des protéines de réponse au stress et de réparation de l'ADN, les clones CA125-knockdown montreraient une moins bonne efficacité de la réparation de l'ADN et de la réponse au stress, d'où l'émergence d'une augmentation de la sensibilité aux agents génotoxiques.

Les analogies faites entre CA125 et MUC1 doivent néanmoins être prises avec un bémol. Bien que CA125 et MUC1 partagent plusieurs fonctions semblables, les queues cytoplasmiques de ces deux mucines sont différentes l'une de l'autre, entre autres par leur taille et leurs sites de phosphorylation et de liaison protéiques. Donc, les fonctions communes à MUC1 et à CA125, plus particulièrement celles de signalisation, sont certainement exercées de manière différente par ces deux protéines. La queue cytoplasmique de CA125 permet donc de créer une réponse qui, en apparence, pourrait être due à la même signalisation que celle effectuée par MUC1, mais qui est en fait due à des fonctions de signalisation unique à CA125.



### 35. Statut de CA125 et traitement du cancer de l'ovaire

À la lumière de ces informations, CA125 semble être un bon candidat en tant que facteur prédictif de la réponse aux traitements de chimiothérapie des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. Dans cette optique, quelques études de corrélation des niveaux de CA125 sérique par rapport à la réponse aux traitements ont été publiées. Lors d'une première étude, le CA125 sérique était considéré comme un bon critère de prédiction de réponse à la thérapie par le taxol et le cisplatine dans 50% à 75% des cas. La conclusion de cette publication encourageait l'utilisation du dosage du CA125 sérique en tant que mesure de réponse au traitement et en tant que critère évaluatif prédictif de réponse à la chimiothérapie. Par contre, dans ce dernier cas, il a été précisé qu'une combinaison du dosage du CA125 sérique avec d'autres critères d'évaluation de la réponse aux traitements demeurerait essentielle (BRIDGEWATER et al, 1999). Dans une deuxième étude, la prédiction de la réponse au taxol par l'analyse du CA125 sérique a été tentée et n'a pas donné de corrélation valable pour fin d'utilisation clinique (NEKULOVA et al, 2002).

La différence majeure entre ce genre d'étude et nos expérimentations réside principalement au niveau du type de CA125 considéré. Dans les études décrites plus tôt, la corrélation de la réponse aux traitements par rapport à CA125 est faite avec le CA125 sérique. C'est donc le CA125 relâché dans le sang par les cellules qui est quantifié. En plus des conclusions plus ou moins encourageantes de ces études, il doit aussi être considéré que le CA125 sérique contient le CA125 relâché par les cellules tumorales, mais aussi celui libéré dans certaines

conditions bénignes, ce qui vient ajouter à la difficulté de prédiction (MEDEN et FATTAHI-MEIBODI, 1998). Par contre, dans le cas des clones stables CA125-knockdown dans la lignée NIH :OVCAR-3 ainsi que pour la population stable SKOV-3 MUC16-CTD, le CA125 étudié est celui présent à la surface des cellules. La présence à la membrane cellulaire de la protéine MUC16-CTD chez les cellules SKOV-3 n'a pas été confirmée mais est probable puisqu'elle possède un domaine transmembranaire. En ayant constaté que la présence de CA125 à la surface des cellules entraîne une moins grande résistance aux agents génotoxiques, le CA125 présent à la surface des tumeurs de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire pourrait devenir un facteur de prédiction de la réponse aux traitements de chimiothérapie. Le CA125 à la surface des tumeurs trahit en fait la présence de la queue cytoplasmique de CA125 dans les cellules. C'est cette queue cytoplasmique qui serait en réalité le véritable facteur prédictif de la réponse à la chimiothérapie, puisque sa présence indique que la signalisation via CA125 s'effectue et entraînerait une atténuation de la réponse aux agents génotoxiques au moment du traitement de chimiothérapie. Bien sûr, des études statistiques devront être faites afin de connaître la validité de cette hypothèse. Toutefois, le fait que les études de sensibilité aux agents génotoxiques aient été faites avec deux lignées cellulaires différentes de cancer de l'ovaire démontre que les résultats obtenus ne sont pas spécifiques à une seule lignée cellulaire, et qu'ils pourraient être extrapolés à la majorité des cas.

## 36. Conclusions et perspectives

Des outils de prédiction de la réponse aux drogues chimiothérapeutiques permettant de personnaliser le traitement d'une patiente pourraient grandement améliorer les taux de réussite de la chimiothérapie du cancer de l'ovaire. Le CA125 présent à la surface des tumeurs, et donc la présence de la queue cytoplasmique de CA125, représente un bon candidat en tant que facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie car, d'après les résultats obtenus, CA125 est impliqué dans la modulation de la sensibilité des cellules de cancer épithélial de l'ovaire aux agents génotoxiques.

Par des essais de perte de fonction du CA125 membranaire, il a été constaté que la présence de CA125 à la surface des cellules entraîne une moins grande sensibilité aux agents génotoxiques, c'est-à-dire les drogues qui créent des dommages à l'ADN. Des expériences plus poussées avec les clones CA125-knockdown ont démontré que la plus grande sensibilité de ces cellules CA125-knockdown pourrait être en partie due à une moins bonne efficacité de réparation de l'ADN et de réponse au stress engendré par ces drogues génotoxiques via la modification de la localisation cellulaire de FOXO3a par AKT. La plus grande sensibilité aux agents génotoxiques, pourraient aussi être due à la modification de molécules ou voies en amont de la caspase-9. Ces modifications pourraient être possibles grâce à la translocation de la queue cytoplasmique de CA125 à la mitochondrie à l'aide de la protéine chaperonne HSP-70, entre autres. Une altération de la voie apoptotique des récepteurs de mort cellulaire n'est pas exclue non plus. Une étude de gain de fonction des

domaines unique, transmembranaire et cytoplasmique de CA125 à l'aide de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD a confirmé la modulation par CA125 de la sensibilité aux agents génotoxiques. Ces résultats suggèrent que CA125 régule négativement l'apoptose induite par les agents génotoxiques, ce qui suppose que le statut en CA125 d'une tumeur pourrait influencer la réponse à la chimiothérapie des patientes atteintes d'un cancer ovarien.

Afin de confirmer cette hypothèse, une étude statistique à l'aide de la technologie de microétagonnage de tissus devrait prochainement être tentée dans le laboratoire. Ces microarrays sont composés de dizaines de coupes de tumeurs humaines de l'ovaire provenant de différentes patientes et ayant été déposées sur une lames. Ces microarrays subiront une immunohistochimie afin de détecter la présence de CA125 à la surface des tumeurs et les résultats seront ensuite corrélés avec le passé chimiothérapeutique de la patiente. Il sera alors possible de distinguer si la réponse ou la résistance aux traitements de chimiothérapie, en particulier avec les drogues génotoxiques, corrèle avec la présence de CA125 à la surface des tumeurs.

De plus, les voies apoptotiques impliquées dans la mort des cellules traitées avec des agents génotoxiques seront étudiées plus en profondeur. Dans les clones CA125-knockdown, la possibilité que l'apoptose induite par le cisplatine débute tout d'abord par la voie des récepteurs de mort cellulaire et converge ensuite vers la voie mitochondriale sera investiguée. Si cette hypothèse s'avère vraie, la plus grande sensibilité des clones CA125-knockdown aux agents génotoxiques et aux ligands TRAIL et FasL (données non-publiées) pourrait avoir une cause commune. Entre autres, l'activation de Bid en t-Bid par la caspase-

8 dans les clones CA125-knockdown sera examinée afin de confirmer la transition voie extrinsèque-intrinsèque. De plus, lors d'un traitement au cisplatine, il y aura analyse temporelle des événements des cascades apoptotiques des voies extrinsèque et intrinsèque. Ce type d'expérience permettra de connaître quel événement de la cascade apoptotique survient en premier et ainsi de déterminer une séquence chronologique des réactions se produisant lors du traitement au cisplatine des clones CA125-knockdown par rapport aux cellules contrôles.

L'hypothèse de la translocation de la queue cytoplasmique de CA125 pourra être vérifiée à l'aide de la population stable SKOV-3 MUC16-CTD et de ses étiquettes polyhistidine et c-myc. La possible translocation de MUC16-CTD à la mitochondrie sera vérifiée par immunofluorescence indirecte sur lame afin de préciser le mécanisme par lequel CA125 remplit son rôle protecteur contre l'apoptose induite par les agents génotoxiques.

À plus long terme, des populations stables MUC16-CTD seront générés dans la lignée CaOv-3, qui est une lignée de cancer de l'ovaire très sensible au cisplatine. Il sera intéressant de voir l'effet protecteur de CA125 contre l'apoptose induite par le cisplatine sur ce type de lignée, qui est beaucoup plus sensible aux agents chimiothérapeutiques que les SKOV-3 utilisés initialement. De plus, l'implication de CA125 dans la sensibilité aux ROS sera déterminée. Cette perspective de projet est d'autant plus pertinente que, dans le système génital féminin, la présence d'œstrogènes entraîne la génération de ROS (FELTY et ROY, 2005). De plus, la protection de la cellule contre ces ROS est entre autres réalisée via FOXO3a, ce qui nous permet de suggérer que les clones CA125-knockdown seront

probablement plus sensibles à ces espèces d'oxygène réactives puisqu'il y a un moins haut niveau de ce facteur de transcription dans le noyau par rapport aux cellules contrôles.

Finalement, les interactions potentielles de CA125 avec les protéines identifiées par spectrométrie de masse lors de l'expérience d'immunoprécipitation de CA125 endogène seront vérifiées. Ainsi, lorsque la méthode de purification de protéines par colonne de nickel sera au point, l'identification de protéines interagissant avec CA125 pourra être faite à l'aide du TAP. Les partenaires d'interaction identifiés permettront de cibler des voies de signalisation dans lesquelles CA125 pourrait être impliqué.

## REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier Dre Claudine Rancourt, ma directrice de recherche, de m'avoir admis dans son laboratoire. Les années que j'y ai passées m'ont donné l'occasion de grandir autant sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie Dr Alain Piché pour les commentaires constructifs qu'il a apporté à mon projet.

Merci à Denis Lane pour m'avoir apporté aide et réponses à mes questions.

Je remercie les étudiants et étudiantes ainsi que les techniciennes de laboratoire que j'ai côtoyés tout au long de ma maîtrise. C'est l'ambiance qui fait le laboratoire. Aux stagiaires Caroline Lemieux et Julie Voyer qui ont travaillé sur mon projet, merci de votre contribution.

Je tiens aussi à remercier Dr Antonio Conconi et Dr François Boudreau d'avoir accepter de réviser ce mémoire.

Un merci spécial à Yannick, mon copain, qui a su me soutenir tout au long de mes études graduées, dans les moments pénibles comme dans les plus remarquables. Ses encouragements ont une grande part de responsabilité dans la réussite de ce volet de ma vie.

## RÉFÉRENCES

- Adams JM. Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*. 14(6):715-20, 2002 Dec.
- Adams JM. Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*. 26(1):61-6, 2001 Jan.
- Adrain C. Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*. 26(6):390-7, 2001 Jun.
- Agarwal R. Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature Reviews. Cancer*. 3(7):502-16, 2003 Jul.
- Ahn HJ. Kim YS. Kim JU. Han SM. Shin JW. Yang HO. Mechanism of taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 91(5):1043-52, 2004 Apr 1.
- Amé JC. Spenlehauer C. de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays*. 26(8):882-93, 2004 Aug.
- Arboleda MJ. Lyons JF. Kabbinar FF. Bray MR. Snow BE. Ayala R. Danino M. Karlan BY. Slamon DJ. Overexpression of AKT2/protein kinase B $\beta$  leads to up-regulation of b1 integrin, increase invasion and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer research*. 63; 196-206. 2003.
- Ashkenazi A. Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281(5381):1305-8, 1998 Aug 28.
- Austin CA. Marsh KL. Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays*. 20(3):215-26, 1998 Mar.
- Balch C. Huang TH. Brown R. Nephew KP. The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 191(5):1552-72, 2004 Nov.
- Barbati A. Anceschi MM. Broccucci L. Cosmi EV. CA 125 is released by human amnion cells in culture. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 162(1):266-8, 1990 Jan.
- Barondes SH. Cooper DN. Gitt MA. Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*. 269(33):20807-10, 1994 Aug 19.



Bartlett JMS. Ovarian Cancer, Methods and protocols. Humana Press. Totowa, NJ. 817 pages. 2000.

Bast RC Jr. Feeney M. Lazarus H. Nadler LM. Colvin RB. Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*. 68(5):1331-7, 1981 Nov.

Bast RC Jr. Klug TL. St John E. Jenison E. Niloff JM. Lazarus H. Berkowitz RS. Leavitt T. Griffiths CT. Parker L. Zurawski VR Jr. Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 309(15):883-7, 1983 Oct 13.

Beatty P. Hanisch FG. Stolz DB. Finn OJ. Ciborowski P. Biochemical characterization of the soluble form of tumor antigen MUC1 isolated from sera and ascites fluid of breast and pancreatic cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 7(3 Suppl):781s-787s, 2001 Mar.

Beaudin J. Anticorps monovalents modifies anti-CA125: Nouveaux inhibiteurs de l'antigène tumoral CA125. Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de microbiologie et infectiologie. Faculté de médecine. 142 pages. Juin 2003.

Berchuck A. Soisson AP. Clarke-Pearson DL. Soper JT. Boyer CM. Kinney RB. McCarty KS Jr. Bast RC Jr. Immunohistochemical expression of CA 125 in endometrial adenocarcinoma: correlation of antigen expression with metastatic potential. *Cancer Research*. 49(8):2091-5, 1989 Apr 15.

Boatright KM. Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15(6):725-31, 2003 Dec.

Boulikas T. Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncology Reports*. 10(6):1663-82, 2003 Nov-Dec.

Brayman M. Thathiah A. Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reproductive Biology & Endocrinology*. 2:4, 2004 Jan 7.

Bridgewater JA. Nelstrop AE. Rustin GJ. Gore ME. McGuire WP. Hoskins WJ. Comparison of standard and CA-125 response criteria in patients with epithelial ovarian cancer treated with platinum or paclitaxel. *Journal of Clinical Oncology*. 17(2):501-8, 1999 Feb.

Byrd JC. Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer & Metastasis Reviews*. 23(1-2):77-99, 2004 Jan-Jun.

Cain K. Bratton SB. Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*. 84(2-3):203-14, 2002 Feb-Mar.

Carlsson SR. Dans Fukuda M. Kobota A. Glycobiology A practical approach. The practical approach series. Series editors : D Rickwood and BD Hames. 1993.

Carraway KL. Ramsauer VP. Haq B. Carothers Carraway CA. Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays*. 25(1):66-71, 2003 Jan.

Chen M. Wang J. Initiator caspases in apoptosis signalling pathways. *Apoptosis*. Vol 7. pp 313-319. 2002.

Chen T. Pengetnze Y. Taylor CC. Src inhibition enhances paclitaxel cytotoxicity in ovarian cancer cells by caspase-9-independent activation of caspase-3. *Molecular Cancer Therapeutics*. 4(2):217-24, 2005 Feb.

Claus EB. Schildkraut JM. Thompson WD. Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*. 77(11):2318-24, 1996 Jun 1.

Cory S. Adams JM. The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*. Vol 2. 647-656. 2002.

Cory S. Huang DC. Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 22(53):8590-607, 2003 Nov 24.

Cowin P. Rowlands TM. Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology*. 17(5):499-508, 2005 Oct.

Creagh EM. Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochemical Society Transactions*. 29(Pt 6):696-702, 2001 Nov.

Danguy A. Camby I. Kiss R. Galectins and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1572(2-3):285-93, 2002 Sep 19.

Davis HM. Zurawski VR Jr. Bast RC Jr. Klug TL. Characterization of the CA 125 antigen associated with human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Research*. 46(12 Pt 1):6143-8, 1986 Dec.

Dekker J. Rossen JW. Buller HA. Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends in Biochemical Sciences*. 27(3):126-31, 2002 Mar.

Devine PL. McGuckin MA. Ward BG. Circulating mucins as tumor markers in ovarian cancer. *Anticancer Research*. 12(3):709-17, 1992 May-Jun.

Didier C. Broday L. Bhoumik A. Israeli S. Takahashi S. Nakayama K. Thomas SM. Turner CE. Henderson S. Sabe H. Ronai Z. RNF5, a RING finger protein that regulates cell motility by targeting paxillin ubiquitination and altered localization. *Molecular & Cellular Biology*. 23(15):5331-45, 2003 Aug.

Dorr RT. VonHoff DD. Cancer chemotherapy handbook. 2e edition. Edition Appleton and Lange. USA, 1994.

Edinger AL. Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 16(6):663-9, 2004 Dec.

Felty Q. Roy D. Mitochondrial signals to nucleus regulate estrogen-induced cell growth. *Medical Hypotheses*. 64(1):133-41, 2005.

Fendrick JL. Konishi I. Geary SM. Parmley TH. Quirk JG Jr. O'Brien TJ. CA125 phosphorylation is associated with its secretion from the WISH human amnion cell line. *Tumour Biology*. 18(5):278-89, 1997.

Fleming JS. Beaugié CR. Haviv I. Chevenix-Trench G. Tan AL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Nov 2005.

Forler D. Kocher T. Rode M. Gentzel M. Izaurralde E. Wilm M. An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nature Biotechnology*. 21(1):89-92, 2003 Jan.

Fowler JC. Teixeira AS. Vinall LE. Swallow DM. Hypervariability of the membrane-associated mucin and cancer marker MUC1. *Human Genetics*. 113(6):473-9, 2003 Nov.

Fraser M. Leung B. Jahani-Asl A. Yan X. Thompson WE. Tsang BK. Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reproductive Biology & Endocrinology*. 1:66, 2003 Oct 7.

Frisch SM. Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*. 13(5):555-62, 2001 Oct.

Fuentes-Prior P. Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*. 384(Pt 2):201-32, 2004 Dec 1.

Fujita E. Egashira J. Urase K. Kuida K. Momoi T. Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo. *Cell Death & Differentiation*. 8(4):335-44, 2001 Apr.

Fujita M. Enomoto T. Murata Y. Genetic alterations in ovarian carcinoma: with specific reference to histological subtypes. *Molecular & Cellular Endocrinology*. 202(1-2):97-9, 2003 Apr 28.

Gadducci A. Cosio S. Muraca S. Genazzani AR. Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 23(5):390-6, 2002.

Geffen DB. Man S. New drugs for the treatment of cancer, 1990-2001. *Israel Medical Association Journal: Imaj*. 4(12):1124-31, 2002 Dec.

Ginath S. Menczer J. Fintsi Y. Ben-Shem E. Glezerman M. Avinoach I. Tissue and serum CA125 expression in endometrial cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. 12(4):372-5, 2002 Jul-Aug.

Green DR. Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. Vol 281 (5381). August 28, 1998. pp 1309-1312.

Grimwood J. Gordon LA. Olsen A. Terry A. Schmutz J. Lamerdin J. Hellsten U. Goodstein D. Couronne O. Tran-Gyamfi M. Aerts A. Altherr M. Ashworth L. Bajorek E. Black S. Branscomb E. Caenepeel S. Carrano A. Caoile C. Chan YM. Christensen M. Cleland CA. Copeland A. Dalin E. Dehal P. Denys M. Detter JC. Escobar J. Flowers D. Fotopulos D. Garcia C. Georgescu AM. Glavina T. Gomez M. Gonzales E. Groza M. Hammon N. Hawkins T. Haydu L. Ho I. Huang W. Israni S. Jett J. Kadner K. Kimball H. Kobayashi A. Larionov V. Leem SH. Lopez F. Lou Y. Lowry S. Malfatti S. Martinez D. McCready P. Medina C. Morgan J. Nelson K. Nolan M. Ovcharenko I. Pitluck S. Pollard M. Popkie AP. Predki P. Quan G. Ramirez L. Rash S. Retterer J. Rodriguez A. Rogers S. Salamov A. Salazar A. She X. Smith D. Slezak T. Solovyev V. Thayer N. Tice H. Tsai M. Ustaszewska A. Vo N. Wagner M. Wheeler J. Wu K. Xie G. Yang J. Dubchak I. Furey TS. DeJong P. Dickson M. Gordon D. Eichler EE. Pennacchio LA. Richardson P. Stubbs L. Rokhsar DS. Myers RM. Rubin EM. Lucas SM. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature*. 428(6982):529-35, 2004 Apr 1.

Grossman J. Molecular mechanisms of detachment induced apoptosis- Anoikis. *Apoptosis*. Vol 1. pp247-260. 2002.

Guaita S. Puig I. Franci C. Garrido M. Dominguez D. Batlle E. Sancho E. Dedhar S. De Herreros AG. Baulida J. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *Journal of Biological Chemistry*. 277(42):39209-16, 2002 Oct 18.

Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *British Medical Bulletin*. 47(1):87-98, 1991 Jan.

Guppy AE. Rustin GJ. CA125 response: can it replace the traditional response criteria in ovarian cancer?. *Oncologist*. 7(5):437-43, 2002.

Hajra KM. Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis*. 9(6):691-704, 2004 Nov.

Hanahan D. Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1):57-70, 2000 Jan 7.

Hanisch FG. Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 10(5):439-49, 2000 May.

Heiser D. Labi V. Erlacher M. Villunger A. The Bcl-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease. *Experimental Gerontology*. 39(8):1125-35, 2004 Aug.

Herbst RS. Khuri FR. Mode of action of docetaxel - a basis for combination with novel anticancer agents. *Cancer Treatment Reviews*. 29(5):407-15, 2003 Oct.

Higuchi T. Orita T. Katsuya K. Yamasaki Y. Akiyama K. Li H. Yamamoto T. Saito Y. Nakamura M. MUC20 suppresses the hepatocyte growth factor-induced Grb2-Ras pathway by binding to a multifunctional docking site of met. *Molecular & Cellular Biology*. 24(17):7456-68, 2004 Sep.

Higuchi T. Orita T. Nakanishi S. Katsuya K. Watanabe H. Yamasaki Y. Waga I. Nanayama T. Yamamoto Y. Munger W. Sun HW. Falk RJ. Jennette JC. Alcorta DA. Li H. Yamamoto T. Saito Y. Nakamura M. Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney. *Journal of Biological Chemistry*. 279(3):1968-79, 2004 Jan 16.

Hollingsworth MA. Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews. Cancer*. 4(1):45-60, 2004 Jan.

Höper J. Spectrometric in vivo determination of local mitochondrial metabolism by use of a tetrazolium salt. *Physiol. Meas.* 18; 61-66, 1997.

Hovig E. Rye PD. Warren DJ. Nustad K. CA 125: the end of the beginning Tumour Biology. 22(6):345-7, 2001 Nov-Dec.

Huang L. Chen D. Liu D. Yin L. Kharbanda S. Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -mediated phosphorylation and degradation of beta-catenin. *Cancer Research*. 65(22):10413-22, 2005 Nov 15.

Hugues RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochemical Society Transactions*. Vol 25. pp 1194-1198. 1997.

Ismail RS. Baldwin RL. Fang J. Browning D. Karlan BY. Gasson JC. Chang DD. Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer Research*. 60(23):6744-9, 2000 Dec 1.

Jepson S. Komatsu M. Haq B. Arango ME. Huang D. Carraway CAC. Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27kip, but not activate mitogen-activated kinase or protein kinase B/Akt pathways. *Oncogene*. 21, 7524-7532. 2002.

Jordan MA. Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews. Cancer*. 4(4):253-65, 2004 Apr.

Kabawat SE. Bast RC. Welch WR. Knapp RC. Colvin RB. Immunopathologic characterization of a monoclonal antibody that recognizes common surface antigens of human ovarian tumors of serous, endometrioid, and clear cell types. *American Journal of Clinical Pathology*. 79(1):98-104, 1983 Jan.

Kaku T. Ogawa S. Kawano Y. Ohishi Y. Kobayashi H. Hirakawa T. Nakano H. Histological classification of ovarian cancer. *Medical Electron Microscopy*. 36(1):9-17, 2003 Mar.

Kalil NG. McGuire WP. Chemotherapy for advanced epithelial ovarian carcinoma. *Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 16(4):553-71, 2002 Aug.

Kaneko SJ. Gerasimova T. Smith ST. Lloyd KO. Suzumori K. Young SR. CA125 and UQCRFS1 FISH studies of ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*. 90(1):29-36, 2003 Jul.

Karsten U. von Mensdorff-Pouilly S. Goletz S. What makes MUC1 a tumor antigen?. *Tumour Biology*. 26(4):217-20, 2005 Jul-Aug.

Kimberley FC. Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Research*. 14(5):359-72, 2004 Oct.

Kishi T. Grass L. Soosaipillai A. Scorilas A. Harbeck N. Schmalfeldt B. Dorn J. Mysliwiec M. Schmitt M. Diamandis EP. Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer research*. 63, 2771-2774. June1, 2003.

Konishi I. Fendrick JL. Parmley TH. Quirk JG Jr. O'Brien TJ. Epidermal growth factor enhances secretion of the ovarian tumor-associated cancer antigen CA125 from the human amnion WISH cell line. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 1(1):89-96, 1994 Jan-Mar.

Kops GJ. Burgering BM. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *Journal of Molecular Medicine*. 77(9):656-65, 1999 Sep.

Kroemer G. Petit P. Zamzami N. Vayssiere JL. Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB Journal*. 9(13):1277-87, 1995 Oct.

Kui Wong N. Easton RL. Panico M. Sutton-Smith M. Morrison JC. Lattanzio FA. Morris HR. Clark GF. Dell A. Patankar MS. Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *Journal of Biological Chemistry*. 278(31):28619-34, 2003 Aug 1.

Levine DA. Bogomolny F. Yee CJ. Lash A. Barakat RR. Borgen PI. Boyd J. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clinical Cancer Research*. 11(8):2875-8, 2005 Apr 15.

Li Y. Bharti A. Chen D. Gong J. Kufe D. Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Molecular & Cellular Biology*. 18(12):7216-24, 1998 Dec.

Li Y. Yu WH. Ren J. Chen W. Huang L. Kharbanda S. Loda M. Kufe D. Heregulin targets gamma-catenin to the nucleolus by a mechanism dependent on the DF3/MUC1 oncoprotein. *Molecular Cancer Research: MCR*. 1(10):765-75, 2003 Aug.

Lillehoj EP. Han F. Kim KC. Mutagenesis of a Gly-Ser cleavage site in MUC1 inhibits ectodomain shedding. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 307(3):743-9, 2003 Aug 1.

Liotta LA. Kohn E. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature*. 430(7003):973-4, 2004 Aug 26.

Liu AX. Testa JR. Hamilton TC. Jove R. Nicosia SV. Cheng JQ. AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Research*. 58(14):2973-7, 1998 Jul 15.

Liu JW. Chandra D. Rudd MD. Butler AP. Pallotta V. Brown D. Coffey PJ. Tang DG. Induction of prosurvival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS. *Oncogene*. 24(12):2020-31, 2005 Mar 17.

Lloyd KO. Yin BW. Kudryashov V. Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA 125 using a new monoclonal antibody (VK-8): identification as a mucin-type molecule. *International Journal of Cancer*. 71(5):842-50, 1997 May 29.

Lloyd KO. Yin BWT. Synthesis and secretion of the ovarian cancer antigen CA125 by the human cancer cell line NIH:OVCAR-3. *Tumor Biology*. 22; 77-82. 2001.

Lodish. Baltimore. Berk. Zipursky. Matsudaira. Darnell. *Biologie moléculaire de la cellule*. 3e édition. DeBoeck Université. 1997. 1344 pages.

Lu KH. Patterson AP. Wang L. Marquez RT. Atkinson EN. Baggerly KA. Ramoth LR. Rosen DG. Liu J. Hellstrom I. Smith D. Hartmann L. Fishman D. Berchuck A. Schmandt R. Whitaker R. Gershenson DM. Mills GB. Bast RC Jr. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clinical Cancer Research*. 10(10):3291-300, 2004 May 15.

MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicology Letters*. 139(2-3):89-97, 2003 Apr 4.

Maeda T. Inoue M. Koshiba S. Yabuki T. Aoki M. Nunokawa E. Seki E. Matsuda T. Motoda Y. Kobayashi A. Hiroyasu F. Shirouzu M. Terada T. Hayami N. Ishizuka Y. Shinya N. Tatsuguchi A. Yoshida M. Hirota H. Matsuo Y. Tani K. Arakawa T. Carninci P. Kawai J. Hayashizaki Y. Kigawa T. Yokoyama S. Solution structure of the SEA domain from the murine homologue of ovarian cancer antigen CA125 (MUC16). *Journal of Biological Chemistry*. 279(13):13174-82, 2004 Mar 26.

- Makhija S. Taylor DD. Gibb RK. Gercel-Taylor C. Taxol-induced bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids. *International Journal of Oncology*. 14(3):515-21, 1999 Mar.
- Markman M. The role of CA-125 in the management of ovarian cancer. *The Oncologist*. (2) 6-9, 1997.
- Marth C. Fuith LC. Bock G. Daxenbichler G. Dapunt O. Modulation of ovarian carcinoma tumor marker CA-125 by gamma-interferon. *Cancer Research*. 49(23):6538-42, 1989 Dec 1.
- Marth C. Zeimet AG. Bock G. Daxenbichler G. Modulation of tumour marker CA-125 expression in cultured ovarian carcinoma cells. *European Journal of Cancer*. 28A(12):2002-6, 1992.
- Marth C. Zeimet AG. Widschwendter M. Daxenbichler G. Regulation of CA 125 expression in cultured human carcinoma cells. *International Journal of Biological Markers*. 13(4):207-9, 1998 Oct-Dec.
- Martin VR. Ovarian cancer. *Seminars in Oncology Nursing*. Vol 18, No3 (August), pp 174-183. 2002.
- Martin SS. Vuori K. Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1692(2-3):145-57, 2004 Jul 5.
- Matsuda N. Suzuki T. Tanaka K. Nakano A. Rma1, a novel type of RING finger protein conserved from Arabidopsis to human, is a membrane-bound ubiquitin ligase. *Journal of Cell Science*. 114(Pt 10):1949-57, 2001 May.
- Meden H. Fattahi-Meibodi A. CA 125 in benign gynecological conditions. *International Journal of Biological Markers*. 13(4):231-7, 1998 Oct-Dec.
- Menczer J. Zakut H. Schejter SG. Tell L. Zajdel L. Tumor tissue CA125 in ovarian carcinoma patients with normal serum levels. *Int J Gynecol Cancer*, (7), 304-306, 1997.
- Meyer T. Rustin GJS. Role of tumor markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 82(9), 1535-1538. 2000.
- Murdoch WJ. McDonnell AC. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction*. 123(6):743-50, 2002 Jun.
- Nekulova M. Pecan L. Kalabova R. Simickova M. Topolcan O. Pikner R. Vondracek V. Valik D. Predicting response of ovarian cancer to paclitaxel treatment based on trend analysis of serum CA125. *Clinical Chemistry*. 48(8):1364-7, 2002 Aug.
- Norbury CJ. Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. 23(16):2797-808, 2004 Apr 12.



Nustad K. Bast RC Jr. Brien TJ. Nilsson O. Seguin P. Suresh MR. Saga T. Nozawa S. Bormer OP. de Bruijn HW. Nap M. Vitali A. Gadnell M. Clark J. Shigemasa K. Karlsson B. Kreutz FT. Jette D. Sakahara H. Endo K. Paus E. Warren D. Hammarstrom S. Kenemans P. Hilgers J. Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. *Tumour Biology*. 17(4):196-219, 1996.

O'Brien TJ. Beard JB. Underwood LJ. Dennis RA. Santin AD. York L. The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biology*. 22(6):348-66, 2001 Nov-Dec.

O'Brien TJ. Beard JB. Underwood LJ. Shigemasa K. The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumour Biology*. 23(3):154-69, 2002 May-Jun.

Obungu VH. Lee Burns A. Agarwal SK. Chandrasekharapa SC. Adelstein RS. Marx SJ. Menin, a tumor suppressor, associates with nonmuscle myosin II-A heavy chain. *Oncogene*. 22(41):6347-58, 2003 Sep 25.

Osaki M. Oshimura M. Ito H. PI3K-Akt pathway : its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9:667-676. 2004.

Ozols RF. Bookman MA. Connolly DC. Daly MB. Godwin AK. Schilder RJ. Xu X. Hamilton TC. Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell*. 5(1):19-24, 2004 Jan.

Ozols RF. American Cancer Society, Atlas of clinical oncology, Ovarian Cancer. BC Decker Inc. Londres. 246 pages. 2003.

Pack SD. Alper OM. Stromberg K. Augustus M. Ozdemirli M. Miermont AM. Klus G. Rusin M. Slack R. Hacker NF. Ried T. Szallasi Z. Alper O. Simultaneous suppression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 reverses aneuploidy and malignant phenotype of a human ovarian carcinoma cell line. *Cancer Research*. 64(3):789-94, 2004 Feb 1.

Pandey P. Kharbanda S. Kufe D. Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Research*. 55(18):4000-3, 1995 Sep 15.

Parekh H. Simpkins H. The transport and binding of taxol *General Pharmacology*. 29(2):167-72, 1997 Aug.

Park SJ. Wu CH. Gordon JD. Zhong X. Emami A. Safa AR. Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 279(49):51057-67, 2004 Dec 3.

Perez-Vilar J. Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *Journal of Biological Chemistry*. 274(45):31751-4, 1999 Nov 5

Perillo NL. Marcus ME. Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *Journal of Molecular Medicine*. 76(6):402-12, 1998 May.

Peter ME. Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation*. 10(1):26-35, 2003 Jan.

Petros AM. Olejniczak ET. Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1644(2-3):83-94, 2004 Mar 1.

Pinard M. CA125, un régulateur négatif du potentiel invasive des cellules cancéreuses de l'ovaire? Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de microbiologie et infectiologie. Faculté de médecine. Août 2005.

Puig O. Caspary F. Rigaut G. Rutz B. Bouveret E. Bragado-Nilsson E. Wilm M. Seraphin B. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*. 24(3):218-29, 2001 Jul.

Raina D. Kharbanda S. Kufe D. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 279(20):20607-12, 2004 May 14.

Ren J. Agata N. Chen D. Li Y. Yu WH. Huang L. Raina D. Chen W. Kharbanda S. Kufe D. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell*. 5(2):163-75, 2004 Feb.

Ren J. Bharti A. Raina D. Chen W. Ahmad R. Kufe D. MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heegulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90. *Oncogene* pp1-12. 2005.

Ren J. Li Y. Kufe D. Protein kinase C delta regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in beta-catenin signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 277(20):17616-22, 2002 May 17.

Rhei E. Bogomolny F. Federici MG. Maresco DL. Offit K. Robson ME. Saigo PE. Boyd J. Molecular genetic characterization of BRCA1- and BRCA2-linked hereditary ovarian cancers. *Cancer Research*. 58(15):3193-6, 1998 Aug 1.

Rigaut G. Shevchenko A. Rutz B. Wilm M. Mann M. Seraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*. 17(10):1030-2, 1999 Oct.

Rump A. Morikawa Y. Tanaka M. Minami S. Umesaki N. Takeuchi M. Miyajima A. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*. 279(10):9190-8, 2004 Mar 5.

Salvesen GS. Abrams JM. Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene*. 23(16):2774-84, 2004 Apr 12.

Salvesen GS. Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 91(4):443-6, 1997 Nov 14.

Sambrook J. Russel DW. Molecular cloning, a laboratory manual. 3e edition. CSHL Press. NY. 2001.

Schroeder JA. Thompson MC. Gardner MM. Gendler SJ. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *Journal of Biological Chemistry*. 276(16):13057-64, 2001 Apr 20.

Schuijjer M. Berns EM. TP53 and ovarian cancer. *Human Mutation*. 21(3):285-91, 2003 Mar.

Schummer M. Ng WV. Bumgarner RE. Nelson PS. Schummer B. Bednarski DW. Hassell L. Baldwin RL. Karlan BY. Hood L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene*. 238(2):375-85, 1999 Oct 1.

Scudiero DA. Shoemaker RH. Paull KD. Monks A. Tierney S. Nofziger TH. Currens MJ. Seniff D. Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*, Vol 48, 17;4827-4833, 1988.

Seelenmeyer C. Wegehingel S. Lechner J. Nickel W. The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1. *Journal of Cell Science*. 116(Pt 7):1305-18, 2003 Apr 1.

Sen P. Mukherjee S. Ray D. Raha S. Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 253(1-2):241-6, 2003 Nov.

Shack S. Wang XT. Kokkonen GC. Gorospe M. Longo DL. Holbrook NJ. Caveolin-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway increases arsenite cytotoxicity. *Molecular & Cellular Biology*. 23(7):2407-14, 2003 Apr.

Shayesteh L. Lu Y. Kuo WL. Baldocchi R. Godfrey T. Collins C. Pinkel D. Powell B. Mills GB. Gray JW. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature Genetics*. 21(1):99-102, 1999 Jan.

Shevchenko A. Schaff D. Roguev A. Pijnappel WW. Stewart AF. Shevchenko A. Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective. *Molecular & Cellular Proteomics*. 1(3):204-12, 2002 Mar.

Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*, Vol.9, 459-470, March 2002.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 22(47):7265-79, 2003 Oct 20.

Skurk C. Maatz H. Kim HS. Yang J. Abid MR. Aird WC. Walsh K. The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *Journal of Biological Chemistry*. 279(2):1513-25, 2004.

Slee EA. Harte MT. Kluck RM. Wolf BB. Casiano CA. Newmeyer DD. Wang HG. Reed JC. Nicholson DW. Alnemri ES. Green DR. Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *Journal of Cell Biology*. 144(2):281-92, 1999 Jan 25.

Smith JA. Ngo H. Martin MC. Wolf JK. An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecologic Oncology*. 98(1):141-5, 2005 Jul.

Srinivasula SM. Ahmad M. Fernandes-Alnemri T. Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular Cell*. 1(7):949-57, 1998 Jun.

Sunters A. Fernandez de Mattos S. Stahl M. Brosens JJ. Zoumpoulidou G. Saunders CA. Coffey PJ. Medema RH. Coombes RC. Lam EW. FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *Journal of Biological Chemistry*. 278(50):49795-805, 2003 Dec 12.

Tammela J. Odunsi K. Gene expression and prognostic significance in ovarian cancer. *Minerva Ginecologica*. 56(6):495-502, 2004 Dec.

Taylor-Papadimitriou J. Burchell J. Miles DW. Dalziel M. MUC1 and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1455(2-3):301-13, 1999 Oct 8.

Thathiah A. Blobel CP. Carson DD. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *Journal of Biological Chemistry*. 278(5):3386-94, 2003 Jan 31.

Tolis C. Peters GJ. Ferreira CG. Pinedo HM. Giaccone G. Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *European Journal of Cancer*. 35(5):796-807, 1999 May.

Tsuji AB. Sudo H. Sugyo A. Otsuki M. Miyagishi M. Taira K. Imai T. Harada YN. A fast, simple method for screening radiation susceptibility genes by RNA interference. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 333(4):1370-7, 2005 Aug 12.

von Mensdorff-Pouilly S. Snijdwint FG. Verstraeten AA. Verheijen RH. Kenemans P. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *International Journal of Biological Markers*. 15(4):343-56, 2000 Oct-Dec.

Wajchman HJ. Pierce CW. Varma VA. Issa MM. Petros J. Dombrowski KE. Ex vivo expansion of CD8+CD56+ and CD8+CD56- natural killer T cells specific for MUC1 mucin. *Cancer Research*. 64(3):1171-80, 2004 Feb 1.

Walczak H. Sprick MR. Biochemistry and function of the DISC. *Trends in Biochemical Sciences*. 26(7):452-3, 2001 Jul.

Wang N. Cytogenetics and molecular genetics of ovarian cancer. *American Journal of Medical Genetics*. 115(3):157-63, 2002 Oct 30.

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*. 15(22):2922-33, 2001 Nov 15.

Wen Y. Caffrey TC. Wheelock MJ. Johnson KR. Hollingsworth MA. Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. *Journal of Biological Chemistry*. 278(39):38029-39, 2003 Sep 26.

Whitehouse C. Solomon E. Current status of the molecular characterization of the ovarian cancer antigen CA125 and implications for its use in clinical screening. *Gynecologic Oncology*. 88(1 Pt 2):S152-7, 2003 Jan.

Wilder JL. Pavlik E. Straughn JM. Kirby T. Higgins RV. DePriest PD. Ueland FR. Kryscio RJ. Whitley RJ. Nagell J. Clinical implications of a rising serum CA-125 within the normal range in patients with epithelial ovarian cancer: a preliminary investigation. *Gynecologic Oncology*. 89(2):233-5, 2003 May.

Wyllie AH. Bellamy CO. Bubb VJ. Clarke AR. Corbet S. Curtis L. Harrison DJ. Hooper ML. Toft N. Webb S. Bird CC. Apoptosis and carcinogenesis. *British Journal of Cancer*. 80 Suppl 1:34-7, 1999 Jul.

Yin BW. Dnistrian A. Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *International Journal of Cancer*. 98(5):737-40, 2002 Apr 10.

Yin BW. Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *Journal of Biological Chemistry*. 276(29):27371-5, 2001 Jul 20.

Yin L. Huang L. Kufe D. MUC1 oncoprotein activates the FOXO3a transcription factor in a survival response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 279(44):45721-7, 2004 Oct 29.

Yin L. Li Y. Ren J. Kuwahara H. Kufe D. Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 278(37):35458-64, 2003 Sep 12.

Yuspa SH. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis*. 21(3):341-4, 2000.

Zhang H. Kong B. Qu X. Jia L. Deng B. Yang Q. Biomarkers discovery for ovarian cancer using SELDI-TOF. *Gynecologic oncology*. 2005 Sept 8.

Zimmermann KC. Bonzon C. Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*. 92(1):57-70, 2001 Oct.

Zou H. Li Y. Liu X. Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*. 274(17):11549-56, 1999 Apr 23.

[www.canal-u.education.fr](http://www.canal-u.education.fr)

<http://kugi.kribb.re.kr/KUGI/doc/pME18S-FL3/>

[www.coloncancer.org/adeasy/pAdTrack-CMV.jpg](http://www.coloncancer.org/adeasy/pAdTrack-CMV.jpg)